

ÉTUDE DU MORPHOTYPE TORULEUX CHEZ *FRANKIA* SPP.

par

Vanessa Gagnon

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2015

Le 3 septembre 2015

*le jury a accepté le mémoire de Madame Vanessa Gagnon
dans sa version finale*

Membres du jury

Professeur Sébastien Roy
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Ryszard Brzezinski
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Professeure Pascale Beauregard
Évaluatrice interne
Département de biologie

Professeur François Malouin
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

L'environnement exerce une pression constante sur les microorganismes qui s'y développent. Ces derniers subissent constamment des variations de température, de pH, de salinité, etc. Pour y répondre, les bactéries doivent posséder des mécanismes de défense afin de survivre face à ces diverses pressions environnementales. La différenciation cellulaire peut s'inscrire comme étant une étape normale du cycle cellulaire ou être une réponse du microorganisme pour répondre à un stress. Ces derniers sont en mesure de détecter les changements dans leur environnement, et c'est l'expression différente des gènes qui va permettre des modifications morphologiques ou fonctionnelles afin de faire face aux stress et d'y survivre.

Frankia sp. est une actinobactérie filamenteuse retrouvée dans des nodules en symbiose avec l'aulne ou de manière saprophyte dans le sol. *Frankia* sp. possède de nombreuses morphologies. Les hyphes végétatifs sont les structures les plus couramment observées dans la nature et en culture *in vitro*. Par ailleurs, on peut retrouver des vésicules qui se rattachent aux hyphes végétatifs et qui permettent de fixer l'azote atmosphérique. On peut aussi observer des sporanges qui contiennent les spores responsables de la dissémination et de la survie du microorganisme. Chez la souche *Frankia* sp. Cj1-82, un quatrième type de morphologie a été observé, les « *Reproductive Torulose Hyphae* » plus couramment connus sous le nom d'hyphes toruleux (RTH). Cette morphologie a aussi été observée chez de nombreuses autres souches de *Frankia* dont *Frankia alni* ACN14a, la souche la plus étudiée dans notre laboratoire.

Les RTH sont présents normalement en faible proportion dans le milieu de culture défini BAPS. Afin de permettre une différenciation massive en RTH de *Frankia alni* ACN14a de manière reproductible, un milieu de culture présentant une concentration de 50 mM en KH_2PO_4 et un pH de 5,85 a été mis au point. Lorsque les microorganismes sont cultivés dans ce milieu de différenciation, le pourcentage de cellules vivantes est faible mais *Frankia alni* ACN14a présente un taux de différenciation en RTH qui atteint presque 100 %. Des études faites préalablement au laboratoire indiquent que la respiration cellulaire de *Frankia alni* ACN14a chutait drastiquement dans le milieu de culture modifié pour la différenciation. De plus, il a été déterminé que la différenciation massive en hyphes toruleux ne se produisait pas avec les souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 lorsqu'elles étaient plongées en milieu modifié malgré une diminution de leur respiration cellulaire.

Mon premier objectif consistait à évaluer l'impact de l'âge relatif du pré-inoculum de *Frankia alni* ACN14a sur sa différenciation en hyphes toruleux. Il s'est avéré que la différenciation en hyphes toruleux se produisait dans certaines phases de croissance seulement, lorsque *Frankia alni* ACN14a était cultivée autant en erlenmeyer de 125 ml qu'en bioréacteur de 2,2 l. L'importance de l'état physiologique des microorganismes pourrait expliquer l'absence de différenciation en RTH chez *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1. Mon second objectif de maîtrise m'a permis de valider l'hypothèse prédisant que le pH acide du milieu modifié pour la différenciation n'était pas essentiel à la recette permettant la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a. En effet, 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 permettait l'induction massive en RTH. À partir de ce point, diverses combinaisons de 50 mM de propionate de sodium et conditions de culture (temps d'incubation et l'impact de la biomasse utilisée au départ) et chimiques (différentes concentrations de KH_2PO_4 , de KCl et d'acide citrique) ont été testées afin de déterminer si l'une d'entre elles permettait

d'augmenter la viabilité cellulaire tout en maintenant une différenciation massive en RTH. Mon troisième objectif de maîtrise consistait à optimiser les conditions de culture en bioréacteur de 2,2 l afin de permettre la différenciation massive en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. Ces essais ont été faits dans le but d'obtenir des quantités suffisantes de RTH pour procéder à des études fondamentales. Une différenciation faible en RTH a été observée dans le bioréacteur de 2,2 l, mais elle n'égalait pas la différenciation massive obtenue en erlenmeyer. L'obtention d'une grande quantité de RTH ouvrirait la porte à des études fondamentales de ce morphotype et permettrait de cibler l'importance de ces structures dans le cycle de vie de *Frankia* sp.

Mots clés: *Frankia* spp., actinomycète, différenciation cellulaire, " *Reproductive Torulose Hyphae* ", RTH, âge relatif, état physiologique, propionate de sodium

REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Professeur Sébastien Roy, de m'avoir permis de découvrir l'univers de *Frankia*. Je tiens à préciser le rôle primordial qu'il a joué dans l'avancement de mon projet de recherche. Nos nombreuses discussions scientifiques ont, à de multiples reprises, permis d'éclairer mes lanternes et m'ont ainsi fait avancer dans la bonne direction. J'aimerais aussi remercier les Prs Carole Beaulieu, François Malouin et Ryszard Brzezinski pour leur implication dans mon projet de recherche et leurs nombreux conseils qui m'ont permis de développer un meilleur esprit critique.

Un merci spécial à Pier-Anne Bélanger qui a su régler, avec brio, un bon nombre de mes problèmes techniques. Nos nombreuses conversations de coin de comptoir m'ont souvent fait réaliser plusieurs points essentiels qui m'ont permis de rendre mes expériences les plus efficaces possible.

Puis, je tiens à remercier tous les membres de mon laboratoire, avec qui j'ai partagé autant de problèmes scientifiques que de nombreux fous rires. Merci d'avoir fait en sorte que mes deux années de maîtrise aient passé si rapidement. Par ailleurs, je tiens à remercier ma famille, qui m'a toujours encouragé à aller plus loin. Finalement, que serait mes remerciements si je n'avais pas remercié mon ami, colocataire et collègue Alexandre Paradis avec qui j'ai parlé, rediscuté, compris, échangé à des centaines de reprises sur mon projet de maîtrise et qui a su m'encourager à poursuivre.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1 Morphologies cellulaires	1
1.2 Les actinomycètes	3
1.3 <i>Frankia</i> spp.	4
1.3.1 Les types de morphologies retrouvées chez <i>Frankia</i> spp.	6
1.4 Les sources de carbone	13
1.4.1 Les Mécanismes de production d'énergie: la glycolyse, le cycle de l'acide citrique (cycle TCA) et la phosphorylation oxydative.....	15
1.4.2 Les intermédiaires du cycle TCA et les autres sources de carbone consommées par <i>Frankia</i> spp.	20
1.5 Les stress tolérés par <i>Frankia</i> spp.....	23
1.6 Les hypothèses et les objectifs du mémoire	25
 CHAPITRE 2: IMPORTANCE DE L'ÂGE RELATIF D'UNE CULTURE DE <i>FRANKIA ALNI/ ACN14A</i> SUR SA CAPACITÉ DE DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX.....	 27
2.1 Références de l'article	27
2.2 Contribution des auteurs.....	28
2.3 Apport et originalité de l'article pour la science	28
2.4 Article	29
 CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN MICROPLAQUES POUR PRODUIRE ET ÉTUDIER LES HYPHES TORULEUX.....	 72
3.1 Mise en contexte	72
3.2 Matériel et méthodes	73
3.2.1 Souches bactériennes utilisées et conditions de croissances	73

3.2.2 Milieux de culture inducteurs étudiés.....	74
3.2.3 Évaluation de la respiration cellulaire des cultures par l'addition du réactif MTS/PMS	75
3.2.4 Méthode de criblage en microplaques 96 puits	76
3.2.4.1 Détermination du seuil de propionate de sodium et combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différents agents inducteurs physiques ou chimiques sur la différenciation en RTH.....	76
3.2.4.2 Effet de la biomasse combiné à 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en RTH	77
3.3 Résultats	80
3.3.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium et effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différents agents inducteurs sur la différenciation en RTH	80
3.3.1.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium	80
3.3.1.2 Détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez la souche <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	84
3.3.1.3 Détermination de la capacité d'induction d'hyphes toruleux pour la souche <i>Frankia</i> sp. ACN10a avec du sodium succinate hexahydrate.....	85
3.3.1.4 Impact du temps (2, 4 et 8 semaines) et de 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux chez <i>Frankia alni</i> ACN14a	87
3.3.1.5 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KH_2PO_4 sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	90
3.3.1.6 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KCl sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	94
3.3.1.7 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations d'acide citrique sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	97
3.3.2 Effet de la biomasse combiné à 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux	100
3.4 Discussion	102
3.4.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez <i>Frankia alni</i> ACN 14a, <i>Frankia</i> sp. ACN10a et <i>Frankia</i> sp. Avcl1	102
3.4.2 Essais d'induction d'hyphes toruleux chez la souche <i>Frankia</i> sp. ACN10a avec diverses concentrations de sodium succinate hexahydrate	105
3.4.3 Combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec divers agents physiques (temps et biomasse) et chimiques (KH_2PO_4 , KCl et acide citrique) sur la différenciation en hyphes toruleux chez <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	107

CHAPITRE 4 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN BIORÉACTEUR DE 2,2 l POUR ÉTUDIER ET POUR PRODUIRE DES HYPHES TORULEUX..... 112

4.1 Mise en contexte	112
4.2 Matériel et méthodes	113

4.2.1 Souche bactérienne utilisée, préparation des inocula, milieux de cultures utilisés, microscopie à épifluorescence et évaluation de la respiration cellulaire des cultures	113
4.2.4 Essai de différenciation en hyphes toruleux à différentes concentrations en oxygène dissout avec le KH_2PO_4 comme agent inducteur, en bioréacteur de 2,2 l	113
4.3 Résultats	115
4.3.1 Résultats obtenus dans le bioréacteur où tous les paramètres ont été fixés à 0 après l'ajout de KH_2PO_4 (essai 1)	115
4.3.2 Bioréacteur où les paramètres ont été maintenus et où l'oxygène dissout a été fixé à 60 % après l'ajout de KH_2PO_4 (essai 2)	117
4.4 Discussion	119
 CHAPITRE 5 : CONCLUSION	 122
ANNEXE	125
BIBLIOGRAPHIE	126

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α	alpha
β	bêta
%	pourcentage
°C	degré Celsius
Acétyl-CoA	acétyl-Coenzyme A
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
CCR	répression catabolique du carbone
cm	centimètre
CMI	concentration minimale inhibitrice
CO ₂	dioxyde de carbone
Cycle TCA	cycle de l'acide tricarboxylique
dO ₂	oxygène dissout
FAD	flavine-adénine
FADH ₂	flavine-adénine-dinucléotide
FMN	flavine-mononucléotide
g	gramme
G6P	glucose-6-phosphate
G-C	liaison guanine-cytosine
kPa	kilopascal
l	litre
l/min	litre/minute
M	molaire
MET	microscopie électronique à transmission
min	minute

ml	millilitre
mm	millimètre
mm ³	millimètre cube
mM	milimolaire
m/s	mètre par seconde
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(carboxymethoxyphenyl) 2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium
MTS/PMS	solution de MTS et de PMS
N	normalité
NAD	nicotineamide-adénine
NADH	nicotineamide-adénine-dinucléotide
NADPH	nicotineamide-adénine-dinucléotide-phosphate
nm	nanomètre
pH	potentiel hydrogène
PMS	méthosulfate de phénazine
PSI	livre-force par pouce carré
qPCR	réaction de polymérisation à la chaîne quantitative
RTH	hyphes toruleux
RPM	rotations par minute
sp.	espèces
spp.	ensemble des espèces
TCA	cycle de l'acide tricarboxylique
TP	température pièce
µg	microgramme
µl	microlitre
µmol	micromole
um	micromètre
x	fois

x g

force gravitationnelle

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2: IMPORTANCE DE L'ÂGE RELATIF D'UNE CULTURE DE *FRANKIA ALNI* ACN14A SUR SA CAPACITÉ DE DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX

1. Paramètres utilisés pour la croissance de *Frankia alni* ACN14a en bioréacteur de 2,2 l 35
2. Présentation des conditions inductrices utilisées pour l'expérience d'induction d'hyphes toruleux à l'échelle d'un bioréacteur de 2,2 l 40
3. Présentation des différents milieux de cultures utilisés pour produire les cellules observées en microscopie électronique à transmission 41
4. Différenciation de *Frankia alni* ACN14a lors des différentes phases de croissance en bioréacteur de 2.2 l 48

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN MICROPLAQUES POUR PRODUIRE ET ÉTUDIER LES HYPHES TORULEUX

1. Présentation des solutions inductrices 74
2. Présentation des conditions expérimentales de chaque série de microplaques 78

CHAPITRE 4: OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN BIORÉACTEUR DE 2,2 l POUR PRODUIRE ET ÉTUDIER LES HYPHES TORULEUX

1. Paramètres utilisés pour la différenciations en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a en bioréacteur de 2L après l'ajout de KH_2PO_4 pour créer un milieu BAPS modifié 114

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.	Différenciation en hétérocyste de certaines cellules d' <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	3
2.	Les hyphes végétatifs retrouvés chez <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	7
3.	Les sporanges retrouvés chez <i>Frankia</i> spp.	9
4.	Les vésicules retrouvées chez <i>Frankia</i> spp.	11
5.	Le morphotype toruleux retrouvé chez <i>Frankia</i> spp.	13
6.	Les enzymes de la glycolyse chez <i>Frankia</i> sp. Arl3	16
7.	La glycolyse (la voie d'Embden-Meyerhof) et le cycle TCA chez les microorganismes procaryotes.....	18

CHAPITRE 2: IMPORTANCE DE L'ÂGE RELATIF D'UNE CULTURE DE *FRANKIA ALNI* ACN14A SUR SA CAPACITÉ DE DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX

1.	Schématisation de l'expérience d'induction des hyphes toruleux à l'échelle d' erlenmeyer de 125 ml	37
2.	Schématisation de l'expérience d'induction des hyphes toruleux à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l	39
3.	Différenciation cellulaire des hyphes de <i>Frankia alni</i> ACN14.....	45
4.	Courbe de croissance de <i>Frankia alni</i> ACN14a cultivé en bioréacteur de 2,2 l	45
5.	Observation de 10 champs microscopiques par microscopie électronique à transmission de <i>Frankia alni</i> ACN14a différenciée en hyphes toruleux dans différents milieux d'induction.....	50
6.	Paramètres de <i>Frankia alni</i> ACN14a en TEM lorsque cultivée dans divers milieux inducteurs d'hyphes toruleux	52

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN MICROPLAQUES POUR PRODUIRE ET ÉTUDIER LES HYPHES TORULEUX

1.	Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez <i>Frankia alni</i> ACN14a. <i>Frankia</i> sp. ACN10a et <i>Frankia</i> sp. Avcl1 en présence de diverses concentrations de propionate de sodium.....	82
2.	Essais de différenciation en hyphes toruleux en présence de 50 mM de propionate de sodium	83
3.	Détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez <i>Frankia alni</i> ACN14a en présence de diverses concentrations de propionate de sodium	84
4.	Effet de différentes concentrations de sodium succinate hexahydrate sur la viabilité de la souche <i>Frankia</i> sp. ACN10a	86
5.	Impact du nombre de semaine d'incubation et de la concentration en propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a	88
6.	Essais de différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a en présence de 50 mM de propionate de sodium à 2, 4 et 8 semaines	89
7.	Impact du KH_2PO_4 seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différentes concentrations de KH_2PO_4 à différents pH sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a	93
8.	Effet du KCl et de la combinaison de 50 mM propionate de sodium à différentes concentrations de KCl à différents pH sur la viabilité de <i>Frankia alni</i> ACN14a	95
9.	Impact du KCl seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différentes concentrations de KCl à différents pH sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a	96
10.	Effet de l'acide citrique seul et de la combinaison de 50 mM propionate de sodium à différentes concentrations d'acide citrique à différents pH sur la viabilité de <i>Frankia alni</i> ACN14a	98
11.	Impact de l'acide citrique seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différentes concentrations d'acide citrique sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a	99
12.	Effet de la biomasse combiné avec 50 mM propionate de sodium sur la viabilité de <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	101

13. Impact de la concentration de biomasses au départ et de 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a	102
---	-----

CHAPITRE 4: OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN BIORÉACTEUR DE 2,2 l POUR ÉTUDIER ET POUR PRODUIRE DES HYPHES TORULEUX

1. Courbe de croissance de <i>Frankia alni</i> ACN14a lorsqu'elle a été cultivée en bioréacteur de 2,2 l	116
2. Formation d'hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a après l'ajout de KH_2PO_4 à une concentration finale de 50 mM dans un bioréacteur de 2,2 l	116
3. Courbe de croissance de <i>Frankia alni</i> ACN14a lorsqu'elle a été cultivée en bioréacteur de 2,2 l	118
4. Formation d'hyphes toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a après l'ajout de KH_2PO_4 à une concentration finale de 50 mM dans un bioréacteur de 2,2 l	118

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Morphologies cellulaires

Les bactéries possèdent une multitude de morphologies cellulaires (Margolin, 2009). Ces dernières passent des coques de *Staphylococcus aureus* ou bâtonnet droit d'*Escherichia coli* à des formes beaucoup plus impressionnantes comme la forme spiralée de *Spirocheta halophila* (Young, 2006) ou encore le morphotype filamenteux retrouvé chez les bactéries du genre *Streptomyces* ou *Frankia* (Pridham *et al.*, 1958; Schwintzer et Tjepkema, 2012). En effet, 5000 espèces regroupées en 1000 genres, ont déjà été répertoriées, mais on évalue que le nombre de morphologies découvertes jusqu'à ce jour ne constitue que la pointe de l'iceberg (Zinder et Dworkin, 2006). Les différentes morphologies que les bactéries peuvent posséder sont le résultat de pressions environnementales sur ces dernières (Margolin, 2009). L'élaboration d'une nouvelle morphologie ainsi qu'un changement dans l'expression des protéines tel que *FtsZ* et *MreB*, est primordial pour assurer la survie des bactéries lors de changements environnementaux (Boor, 2006). La façon dont une bactérie se duplique ou encore modifie sa morphologie est, entre autres, possible grâce aux protéines *FtsZ* et *MreB*. Elles sont responsables de créer un anneau permettant la division bactérienne et de contrôler l'épaisseur de la paroi bactérienne chez les bacilles (Young, 2006; Alyahya *et al.*, 2009).

La plupart du temps, la disponibilité des nutriments est l'un des plus importants facteurs qui détermine la morphologie qu'un microorganisme peut posséder (Weart *et*

al., 2007). Les nutriments permettent de dicter la taille d'une bactérie. Par exemple, chez la levure, une grande disponibilité des nutriments dans son milieu environnemental va se traduire par une plus grande taille de cette dernière (Weart *et al.*, 2007). De plus, dans un milieu pauvre en nutriments, une cellule bactérienne ayant un ratio surface/volume élevé a un avantage compétitif sur l'acquisition des nutriments par rapport à une bactérie présentant un ratio plus faible. De ce fait, les cellules plus petites ou filamenteuses sont les organismes les plus efficaces dans des environnements pauvres en nutriments puisqu'elles ont évolué afin d'optimiser leur capacité d'acquisition des nutriments (Young, 2006). Un autre exemple d'adaptation à un environnement pauvre est la formation d'hétérocystes chez la cyanobactérie appartenant au genre *Anabaena*. Ces hétérocystes permettent une fixation de l'azote atmosphérique (N_2) efficace, dans un milieu limité en azote (Figure 1) (Golden et Yoon, 2003). Ces derniers présentent un microenvironnement favorable à l'enzyme nitrogénase, responsable de fixer l'azote atmosphérique (Benson and Silvester, 1993). Grâce à une enveloppe extérieure à la paroi présentant 3 couches permettant de protéger la nitrogénase de l'oxygène, les hétérocystes sont de véritables usines de fixation de l'azote atmosphérique (Roussard-Jacquemin, 1983). Ainsi, grâce à la machinerie de fixation d'azote d'une cellule différenciée en hétérocystes, environ 10 cellules non différenciées peuvent bénéficier de l'ion NH_4^+ , un élément essentiel pour accomplir les fonctions métaboliques des cellules. Les hétérocystes, quant à eux, obtiennent des substrats carbonés formés par la photosynthèse produite dans les cellules avoisinantes (Bradley et Carr, 1976; Golden et Yoon, 2003). Ceci n'est qu'un exemple parmi tant d'autres où la différenciation morphologique d'une cellule est essentielle pour la survie d'un groupe de bactéries.

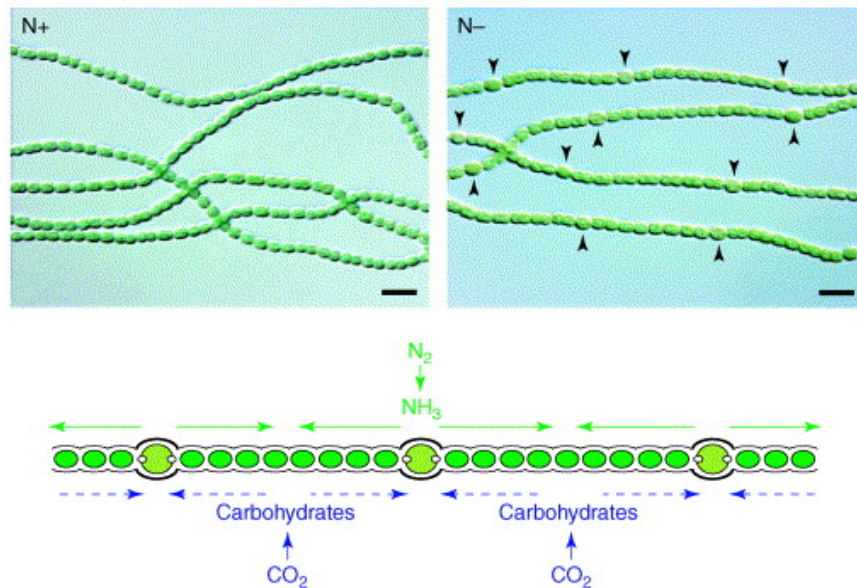


Figure 1: Différenciation en hétérocyste de certaines cellules d'*Anabaena* sp. PCC 7120, les flèches pointent les hétérocystes, figure modifiée tirée de Golden *et al* (2003).

1.2 Les actinomycètes

Le classement des actinomycètes était un véritable casse-tête pour les taxonomistes avant l'arrivée du séquençage. En effet, les actinomycètes présentent des caractéristiques propres aux champignons, comme la production d'un mycélium aérien et des caractéristiques appartenant davantage aux bactéries, notamment leurs activités biochimiques ainsi que leur absence de noyau (Waksman, 1967). Les actinomycètes regroupent plusieurs familles dont les *Streptomyces*. Ces derniers germent à partir de spores et sont les éléments de base pour permettre la reprise de croissance du microorganisme. Les bactéries du genre *Streptomyces* présentent un mycélium végétatif qui peut pénétrer et solubiliser la matière organique grâce à

l'action d'enzymes hydrolytiques. Par ailleurs, les *Streptomyces* possèdent des hyphes aériens constitués de chaînes de spores. Elles sont capables de croître grâce à l'apport en nutriments fournis par le mycélium végétatif. Ces hyphes aériens permettent la formation des spores et ainsi la dissémination du microorganisme (Chater, 1984).

Par ailleurs, les microorganismes sont connus comme étant des producteurs de métabolites secondaires. Ces derniers sont produits en réponse à des stress environnementaux comme la modification de la quantité de nutriments, de l'oxygénation, de la température et du pH. Dans de telles conditions les microorganismes peuvent produire des antibiotiques, des antitumoraux, des molécules immunosuppressives, des antiviraux, des antiparasitiques ainsi que des composés inactivateurs d'enzymes. Avec plus de 10 000 composés bioactifs produits, les actinomycètes détiennent 45 % de tous les métabolites secondaires produits par l'ensemble des microorganismes. Plus précisément, c'est le genre *Streptomyces* qui produit le plus de ces métabolites secondaire avec plus de 7 600 composés (Olago *et al*, 2008).

1.3 *Frankia* spp.

Les actinomycètes comprennent aussi la famille des *Frankiaceae* qui elle comprend un seul genre, soit *Frankia*, qui a ainsi été nommé en l'honneur du microbiologiste suisse Albert Bernhard Frank (Lechevalier, 1994). Les bactéries du genre *Frankia* sont des organismes à Gram positif et qui possèdent un génome riche en liaison G-C (environ 70 %) (Benson et Silvester, 1993; Bassi et Benson, 2007). Les bactéries du

genre *Frankia* ont un temps de doublement extrêmement long, soit de 15 à 48 h. Certaines souches peuvent prendre jusqu'à quelques semaines pour doubler (Schwencke et Carú, 2001; Bassi et Benson, 2007).

Les bactéries appartenant au genre *Frankia* sont retrouvées sous forme libre dans le sol et sont capables d'établir des symbioses avec des plantes actinorhiziennes appartenant à la division des angiospermes (Chaia *et al.*, 2010). Ces dernières sont des plantes pionnières d'environnements pauvres en nutriments, telles que la toundra arctique (*Dryas* spp.) ainsi que les dunes côtières (*Casuarina* spp., *Myrica* spp.) (Benson et Silvester, 1993; Benson et Dawson, 2007). *Frankia* spp. peut former des symbioses avec plus de 220 espèces de plantes actinorhiziennes appartenant à 3 ordres, les Cucurbitales, les Fagales et les Rosales (Bassi et Benson, 2007; Chaia *et al.*, 2010). La symbiose que *Frankia* spp. peut établir avec ses plantes hôtes débute par l'infection d'un poil racinaire ou par un processus de pénétration de l'épiderme ou du cortex de la racine de la plante jusqu'à l'établissement d'une structure appelée nodule (Schwencke et Carú, 2001; Chaia *et al.*, 2010). *Frankia* spp. peut fixer l'azote atmosphérique de façon libre dans le sol ou à l'intérieur du nodule (Benson et Silvester, 1993). La symbiose permet un échange d'ions NH_4^+ résultant de la fixation de N_2 par *Frankia* spp. avec des substrats carbonés produits lors de la photosynthèse chez la plante (Schwencke et Carú, 2001). *Frankia* spp. peut aussi fixer l'azote atmosphérique de façon libre dans le sol, pour produire l'ion ammonium (NH_4^+), qui est un élément limitant pour la croissance de nombreux organismes.

Les microorganismes appartenant au genre *Frankia* sont intéressants puisqu'ils possèdent plusieurs types de morphologies. La prolifération active de *Frankia* spp. est assurée par l'allongement apical des hyphes végétatifs. Grâce à ses vésicules,

Frankia spp. possède la capacité de fixer l'azote de façon libre dans le sol et lors d'une association symbiotique avec une plante actinorhizienne (Benson et Silvester, 1993; Pawlowski et Demchenko, 2012). *Frankia* spp. peut également se reproduire et se disséminer par la production de spores contenues dans les sporanges (Benson et Silvester, 1993). Finalement, un quatrième type de morphologie a été découvert par Diem et Dommergues (1985) chez *Frankia* sp. Cj1-82, les hyphes toruleux. Ce morphotype possède, jusqu'à ce jour, des fonctions nébuleuses et très peu étudiées (Diem et Dommergues, 1985).

1.3.1 Les types de morphologies retrouvées chez *Frankia* spp.

Tel que mentionné précédemment, *Frankia* spp. possède 4 types de morphologies qu'on retrouve couramment dans la majorité des milieux de culture utilisés pour sa croissance, soit les hyphes végétatifs, les sporanges, les vésicules et les hyphes toruleux (Diem et Dommergues, 1985; Benson et Silvester, 1993).

Les hyphes végétatifs

Les hyphes végétatifs représentent le mode de croissance de *Frankia* spp. (Figure 2). En effet, ils sont retrouvés majoritairement dans les milieux de culture *in vitro* utilisés pour faire proliférer *Frankia* spp. L'élongation apicale se produit par l'allongement des hyphes âgés afin que ces derniers puissent produire des cellules plus jeunes (Benson et Silvester, 1993). En microscopie à épifluorescence, grâce à la coloration *LIVE/DEAD®*, on peut remarquer que les hyphes végétatifs de *Frankia* spp.

possèdent plusieurs cellules séparées entre elles par des septations qui sont en continuité avec la paroi cellulaire ainsi qu'avec la membrane plasmique. (Benson et Eveleigh, 1979; Benson et Silvester, 1993). Ces cellules présentent une épaisseur de 0,5 à 1,5 μm et une longueur variable (Benson et Silvester, 1993). De plus, grâce à une observation microscopique de l'ultrastructure (l'intérieure de la cellule) des hyphes végétatifs, il a été démontré que le cytoplasme de ceux-ci est riche en ribosomes, ce qui lui confère une apparence granuleuse (Benson et Eveleigh, 1979). De plus, on observe d'autres types de granules, chez la plupart des cellules, qui pourrait potentiellement être du glycogène ainsi que des petites gouttelettes de lipides. Ces dernières seraient utilisées comme réserve énergétique (Lancelle *et al.*, 1985). Par ailleurs, les hyphes végétatifs possèdent une composition lipidique présentant une proportion d'acides gras polaires beaucoup plus élevée que la proportion d'acides gras neutres et de glycolipides. Cela permet aux cellules d'avoir une membrane fonctionnelle, qui est fluide et qui s'adapte aux nombreux stress du milieu environnant (Tunlid *et al.*, 1989).

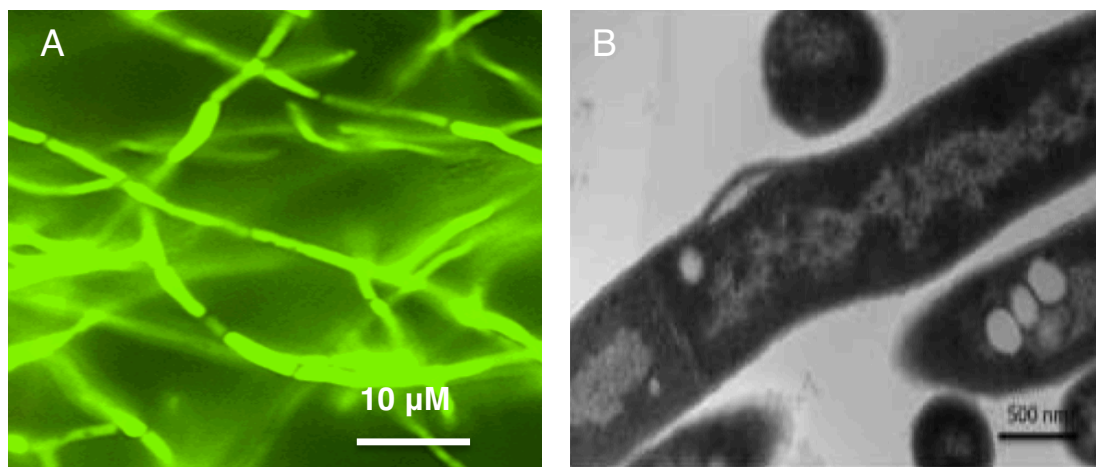


Figure 2: Les hyphes végétatifs retrouvés chez *Frankia alni* ACN14a. (A) l'hyphe végétatif chez *Frankia alni* ACN14a en microscopie à épifluorescence, coloré avec le colorant *LIVE/DEAD®*, à un grossissement total de 1000x, (B) l'hyphe végétatif chez

Frankia alni ACN14a en microscopie électronique à transmission, tiré de Bernèche-D'Amours (2012).

Les sporanges

Les sporanges sont associés à la dissémination et à la reproduction des microorganismes et ces structures ne font pas exception chez *Frankia* spp. (Figure 3) (Krumholz *et al.*, 2003). Ces derniers sont localisés sur les extrémités des hyphes végétatifs, dans la majorité des cas, mais peuvent aussi être intercalaires, c'est-à-dire au milieu des hyphes végétatifs. Ils sont formés par un élargissement de l'hyphe et par la production de nombreuses septations (Newcomb et Wood, 1987; Benson et Silvester, 1993; Bassi et Benson, 2007). Tout dépendamment de la souche de *Frankia* et de la qualité des nutriments dans le milieu de culture, un sporange peut contenir jusqu'à une centaine de spores (Benson et Silvester, 1993; Krumholz *et al.*, 2003). L'éclatement du sporange se produit de façon sporadique et spontanée et permet la libération des spores lorsqu'elles ont atteint leur maturité (Krumholz *et al.*, 2003). Par ailleurs, une analyse du contenu en ADN des spores de *Frankia* sp. ACN1 versus celui contenu dans les hyphes végétatifs a révélé que seulement 9 % des spores contiennent de l'ADN. Ceci explique pourquoi le taux de germination des spores de *Frankia* sp. ACN1 *in vitro* est aussi faible, environ 1 % des spores est en mesure de germer (Krumholz *et al.*, 2003). Certains activateurs sont connus pour améliorer le taux de germination des spores, comme l'addition d'une source d'azote, tel que le NH_4Cl , ainsi que certains exsudats racinaires au milieu BAP (Igual et Dawson, 1999; Krumholz *et al.*, 2003). Certaines souches de *Frankia* sont capables de sporuler à l'intérieur même des nodules. On dit qu'un nodule contenant des spores est sp^+ , tandis qu'un nodule exempt de spore est sp^- (Weber, 1986). Le pouvoir infectieux se

caractérise comme étant la capacité des bactéries contenues dans le nodule d'infecter une nouvelle plante. Ainsi, celui d'un nodule sp^+ est 100 à 1000 fois supérieur à celui d'un nodule sp^- (Burleigh et Torrey, 1990).

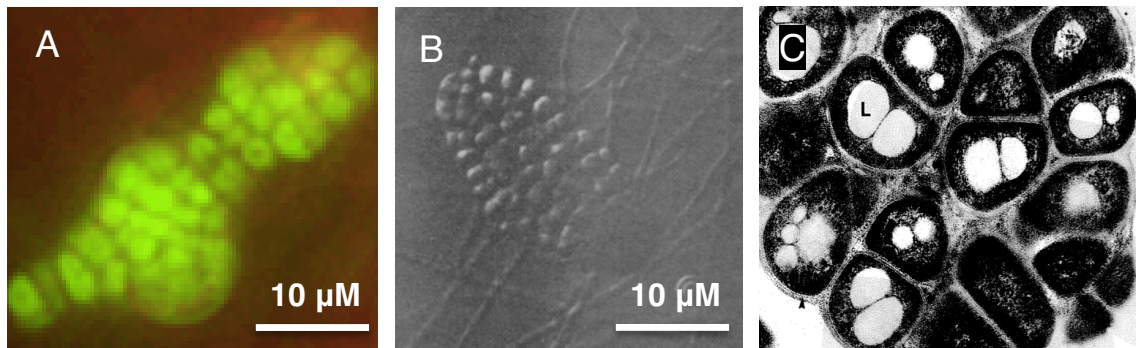


Figure 3: Les sporanges retrouvés chez *Frankia* spp. (A) le sporange chez *Frankia alni* ACN14a en microscopie à épifluorescence, coloré avec le colorant *LIVE/DEAD®* à un grossissement total de 1000x, (B) le sporange de *Frankia* sp. Ccl3 en microscopie électronique à transmission, figure modifiée tirée de Benson et Silvester. (1993), (C) coupe transversale d'un sporange de *Frankia* sp. Eul1 en microscopie électronique à transmission, grossissement total 39 000x, tirée de Baker *et al.* (1980).

Les vésicules

Frankia spp. a la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à des structures spécialisées nommées vésicules (Figure 4) (Benson et Silvester, 1993). Le développement des vésicules se produit lorsque le milieu environnant ne contient pas d'azote ou que les sources d'azote présentes ne peuvent pas être dégradées. La seule façon d'acquérir en quantité suffisante cet élément essentiel à la survie de la bactérie est par la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) (Fontaine *et al.*, 1984;

Noridge et Benson, 1986). La fixation de l'azote atmosphérique (N_2) est possible grâce à une enzyme spécialisée, la nitrogénase (Benson et Silvester, 1993). L'enzyme nitrogénase, contenue à l'intérieur même des vésicules, est extrêmement sensible à l'oxygène (Lamont *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1991). Afin de protéger la nitrogénase de l'oxygène, cette dernière doit être isolée des microenvironnements où des activités métaboliques nécessitant l'utilisation de l'oxygène se produisent dans la vésicule (Berry *et al.*, 1991). Par ailleurs, c'est dans des conditions exemptes d'oxygène que l'on peut mesurer le taux d'activité de l'enzyme nitrogénase. Cette dernière a davantage d'affinité pour l'acétylène que pour l'azote atmosphérique, qu'elle réduit en éthylène. Ce faisant, le dosage de l'éthylène en chromatographie en phase gazeuse permet de déterminer quantitativement le niveau d'activité de l'enzyme (Tjepkema *et al.*, 1980; Fontaine *et al.*, 1984). Les vésicules, composées de différentes couches lipidiques de 3 à 4,5 nm d'épaisseur, créent une barrière contre la diffusion de l'oxygène (Berry *et al.*, 1991). Les lipides composant les membranes de la vésicule sont majoritairement (30 à 50 %) des hopanoides de la classe des bacteriohopanetetrol ($C_{35}H_{62}O_4$) (Berry *et al.*, 1991; Harris et Silvester, 1992a). Un autre fait intéressant est la formation des vésicules 76h postinoculation qui survient lorsque les souches de *Frankia* HFPArl3 et HFPCcl3 sont cultivées en bioréacteur de type discontinu dans un milieu exempt d'azote. Malgré la production de ces dernières, les niveaux d'activité de l'enzyme nitrogénase sont très faibles. L'addition de propionate de sodium (5 mM) ainsi qu'un transfert de la vieille culture dans du milieu frais augmentent les taux de génération des vésicules immatures, les provésicules, en vésicules matures (Harris et Silvester, 1992b).

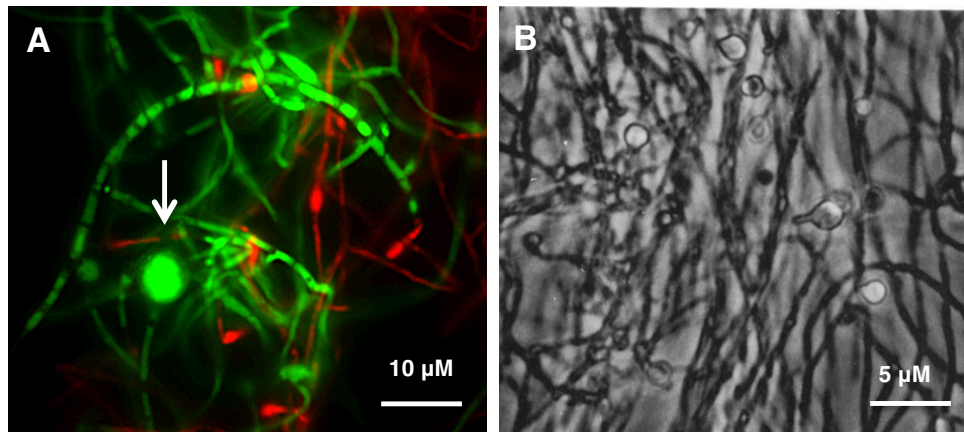


Figure 4: Les vésicules retrouvées chez *Frankia* spp. A) une vésicule de *Frankia alni* ACN14a en microscopie à épifluorescence, colorée avec le colorant LIVE/DEAD® à un grossissement total de 1000x, la flèche blanche pointe une vésicule, B) vésicules de *Frankia* sp. HFPCpl1 en microscopie à contraste de phase durant la fixation de l'azote, tirées de Benson et Silvester (1993).

Les hyphes toruleux

Les premières observations des hyphes toruleux ont été faites à partir d'un isolat de la souche *Frankia* sp. Cj1-82 provenant de nodules de la plante *Casuarina junghuhniana* (Figure 5) (Diem et Dommergues, 1985). C'est l'aspect proéminent et bombé de ces cellules qui leur a valu leur nom de « *Reproductive Torulose Hyphae* », mieux connu sous le nom de RTH. Diem et Dommergues (1985) ont d'abord décrit les RTH comme étant des hyphes végétatifs possédant une segmentation abondante ressemblant à des sporanges intercalaires. Une étude plus approfondie de l'ultrastructure (l'intérieur de la cellule), par microscopie électronique à transmission, des RTH a permis de constater que ces structures présentent 2 couches de lipides distincts dans leur paroi cellulaire, contrairement à 3 chez les sporanges (Diem et

Dommergues, 1985). Ceci a permis de confirmer que les RTH n'étaient pas des sporanges, mais un autre type de morphologie de *Frankia* spp. Selon Diem et Dommergues (1985), les hyphes toruleux possèdent des invaginations de la membrane plasmique (mésosome) qui seraient responsables des septations entre les cellules. Ils ont aussi observé que certaines cellules qui composent les hyphes toruleux contiendraient des granules de polyphosphate ainsi que des corps globuleux de lipides (Figure 4 B) (Diem et Dommergues, 1985). Par ailleurs, c'est en observant la morphologie des RTH chez *Frankia alni* ACN14a, plusieurs années plus tard, que Bernèche-D'Amours (2012) a confirmé que les hyphes toruleux étaient des cellules présentant des septations très abondantes en plus d'un élargissement de l'hyphe. Les hyphes toruleux sont présents de façon normale mais en faible quantité dans les milieux de culture liquide utilisés pour permettre la croissance de *Frankia* spp. Enfin, les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) ont permis de créer un milieu de culture modifié (milieu d'induction des RTH) qui permet la différenciation totale des cellules en RTH. Il est important de noter que la différenciation totale des cellules s'accompagne d'un taux de mortalité très élevé dans ce milieu de culture modifié (Bernèche D'Amours, 2012), soit de l'ordre de 60 à 70 %. Par contre, ce ne sont pas toutes les souches de *Frankia* qui sont inductibles, il semblerait que *Frankia* sp. ACN10a se différencie en phénotype RTH intermédiaire. En effet, en microscopie à épifluorescence, ce ne sont pas des cellules multi-septées, caractéristiques des RTH, que l'on observe mais plutôt des cellules présentant des renflements et des septations en moins grande quantité. *Frankia* sp. Avcl1 ne se différencie pas et ne possède pas de phénotype intermédiaire contrairement à *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a (Lafond-Lambert, 2014).

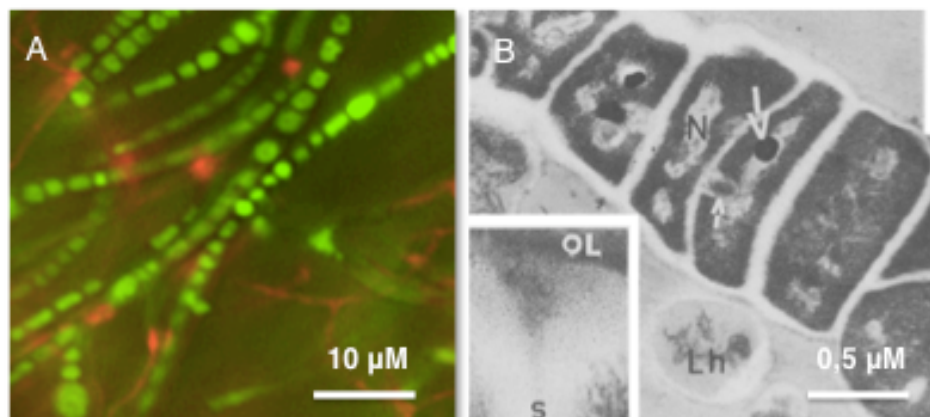


Figure 5: Le morphotype toruleux retrouvé chez *Frankia* spp. (A) l'hyphe toruleux chez *Frankia alni* ACN14a en microscopie à épifluorescence, coloré avec le colorant *LIVE/DEAD®* à un grossissement total de 1000x, (B) l'hyphe toruleux chez la souche *Frankia* sp. Cj1-82 en microscopie électronique à transmission. Lh: hyphe végétatif lysé, N: matériel nucléaire, OL: couche extérieure dense, S: septum entre les cellules, petite flèche blanche: formation du septum entre les cellules, grande flèche blanche: granule de polyphosphate, figure modifiée tirée de Diem et Dommergues, (1985).

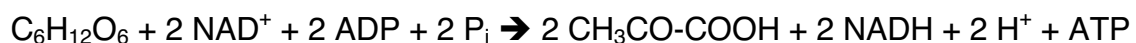
1.4 Les sources de carbone

Au même titre que l'oxygène et l'hydrogène, le carbone est un élément essentiel à la vie. Il est un composant majeur de la structure de l'ensemble des organismes vivants. Il intervient dans la formation du squelette de tous les composés organiques que l'on trouve dans la nature (Prescott *et al.*, 2013). Les microorganismes ne font pas abstraction à cette règle, car le carbone est à la base de leur composition et de leurs besoins nutritionnels. La grande majorité des microorganismes ont un type nutritionnel chimioorganohétérotrophe. De façon plus précise, ce sont des

organismes chimiotrophes, donc qui oxydent les composés organiques et inorganiques pour produire de l'énergie. Leur source d'électron provient des molécules organiques, ils sont donc ainsi des organotrophes. De plus, ce sont des organismes qui sont hétérotrophes quant à l'utilisation de leur source de carbone puisqu'ils utilisent des molécules carbonées, préformées et réduites (sans électrons) tels que des acides organiques, des sucres, de l'hémicellulose, de la cellulose et des protéines provenant la majorité du temps d'autres organismes (Waksman, 1967; Prescott *et al.*, 2013). Par la suite, les nutriments doivent être absorbés à l'intérieur des microorganismes. Ceci est notamment possible par de nombreux moyens tels que par la diffusion passive et facilitée ainsi que par le transport actif. L'utilisation de l'un ou l'autre de ces types de transport est déterminée par le type de molécules à absorber (Prescott *et al.*, 2013). De plus, certaines familles bactériennes, les *Enterobacteriaceae* et les *Firmicutes*, sont en mesure de sélectionner le type de source de carbone qu'elles vont absorber en premier (habituellement le glucose) grâce à un mécanisme de répression catabolique du carbone (CCR) (Deutscher, 2008). Ceci fait en sorte que la bactérie a le choix de la source de carbone qu'elle désire absorber de façon préférentielle et ce, de façon rapide et efficace (Deutscher, 2008). Une fois dans la cellule, les nutriments entreront dans de nombreux cycles (la glycolyse, le cycle de l'acide citrique (TCA) et la phosphorylation oxydative) pour être métabolisés en adénosine triphosphate (ATP), une molécule à haut potentiel énergétique et essentielle à toutes les fonctions qui nécessitent de l'énergie dans la cellule (Prescott *et al.*, 2013).

1.4.1 Les Mécanismes de production d'énergie: la glycolyse, le cycle de l'acide citrique (cycle TCA) et la phosphorylation oxydative

Chez les organismes aérobies et hétérotrophes, la production d'énergie passe essentiellement par la glycolyse (la voie d'Embden-Meyerhof ou la voie d'Entner-Doudoroff et/ou la voie des pentoses phosphates) (Figure 6), par le cycle de l'acide citrique (cycle TCA) aussi connu sous le nom de cycle de Krebs (Figure 7) et finalement par la phosphorylation oxydative (Berg *et al.*, 2013). Plusieurs voies métaboliques peuvent être utilisées par les microorganismes afin de convertir les sucres en pyruvate. Parmi celles-ci, il y a notamment la voie d'Embden-Meyerhof, la voie d'Entner-Doudoroff ainsi que la voie des pentoses phosphates. Dans une mesure de simplicité, seulement la voie la plus commune, soit d'Embden-Meyerhof (Figure 6), sera décrite dans ce mémoire (Prescott *et al.*, 2013). Ainsi, la première voie métabolique de production d'énergie, la voie d'Embden-Meyerhof, est un processus qui se produit de façon aérobie et anaérobie dans le cytoplasme des bactéries (Berg *et al.*, 2013). Une fois que le glucose entre dans la cellule bactérienne, il est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par l'hexokinase. Cette étape est essentielle pour empêcher le glucose de ressortir de la cellule. Le G6P est la molécule de départ de la glycolyse. Par la suite la molécule de G6P va subir une série successive de réactions impliquant plusieurs enzymes dont la phosphofructokinase, et la pyruvate kinase. Le bilan de la glycolyse à partir d'une molécule de glucose est le suivant :



Dans la glycolyse, l'énergie est retrouvée sous deux formes, le NADH et l'ATP. Le NADH servira à transporter les électrons pour les réactions d'oxydoréduction dans la phosphorylation oxydative tandis que l'ATP apporte l'énergie des réactions

endothermiques. Cette étape n'est pas une étape importante de production énergétique, mais plutôt une étape de production de molécules essentielles, pour entrer dans le cycle TCA, soit les deux molécules de pyruvates (Fernie *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2011; Berg *et al.*, 2013).

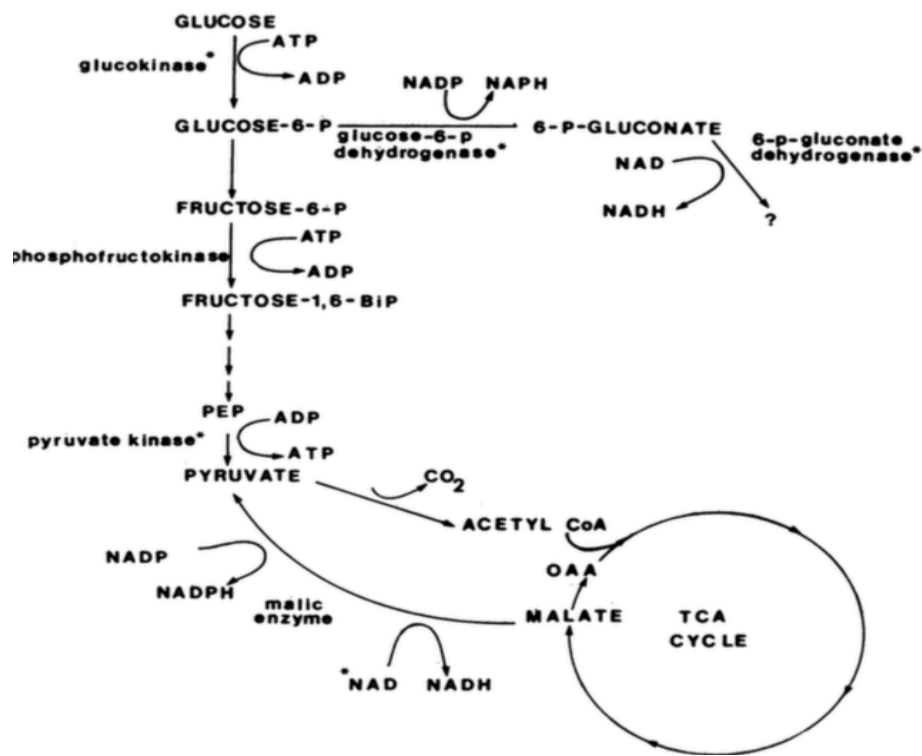
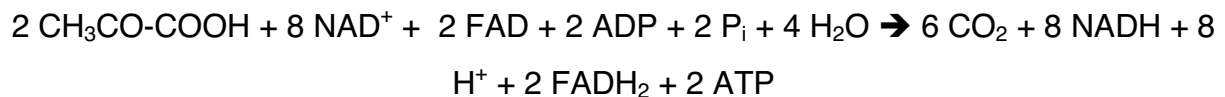


Figure 6 : Les enzymes de la glycolyse chez *Frankia* sp. Arl3, tirée de Lopez et Torrey (1985).

La deuxième étape est le cycle TCA qui se produit dans le cytoplasme des organismes procaryotes. Dans un premier temps, les molécules de pyruvates générées par la voie d'Embden-Meyerhof sont converties en acétyl-Coenzyme A

(Acétyl CoA) par décarboxylation oxydative grâce à l'enzyme pyruvate deshydrogénase, puis c'est cet intermédiaire qui va faire son entrée dans le cycle TCA. Ce dernier sera couplé à l'oxaloactétate pour donner du citrate, puis grâce à 8 réactions successives, comprenant la crotonisation, l'hydratation, l'oxydation, la décarboxylation et la phosphorylation, plusieurs molécules à haut potentiel énergétique seront produites (Briere *et al.*, 2006; Gaster *et al.*, 2012; Berg *et al.*, 2013). Ces réactions sont permises grâce à 8 enzymes (la citrate synthase, l'aconitase, l'isocitrate deshydrogénase, l'alpha-cetoglutarate deshydrogénase, la succinyl-CoA synthase, la sodium succinate hexahydrate deshydrogénase, la fumarate hydratase et la malate deshydrogénase) qui forment le cycle TCA (Gaster *et al.*, 2012). Le bilan global du cycle de Krebs (à partir d'une molécule de glucose) est le suivant :



Le but ultime du cycle TCA n'est toujours pas de générer de l'énergie, mais plutôt de produire les équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) qui seront transféré à la chaîne de transfert des électrons, où se déroule la plus grande production d'énergie. Les molécules de NADH et de FADH₂ représentent une énergie potentielle de 3 et 2 molécules d'ATP, respectivement. Ainsi cela représente 38 molécules d'ATP potentielles en comptant les molécules de NADH produit dans la glycolyse et celles de NADH et FADH₂ produites dans le cycle de Krebs (Ferne *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2011; Berg *et al.*, 2013).

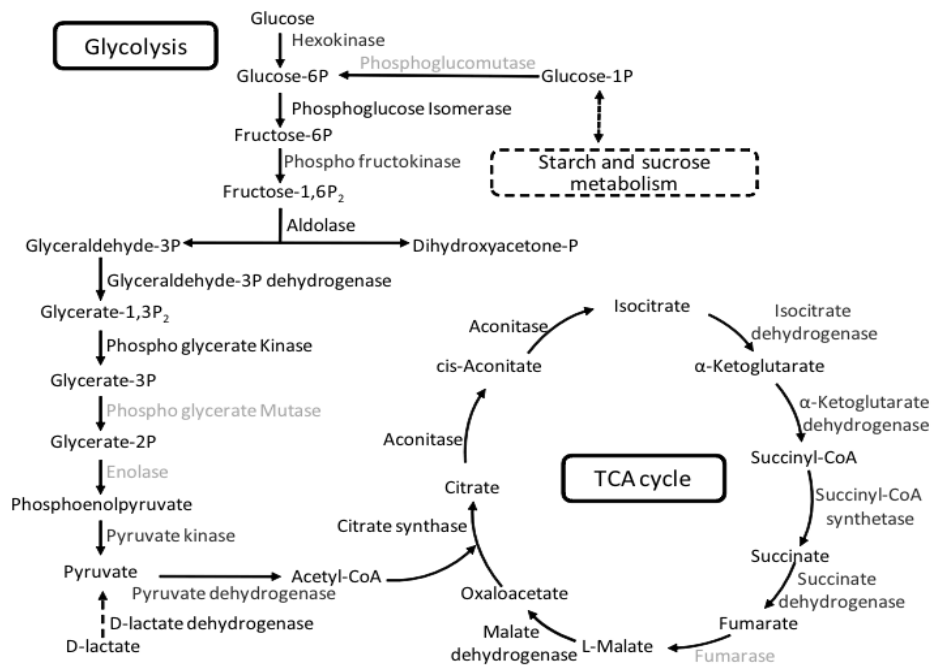


Figure 7: La glycolyse (la voie d'Embden-Meyerhof) et le cycle TCA chez les microorganismes procaryotes, tirée de Xu *et al.* (2015).

La phosphorylation oxydative est la dernière étape et elle permet de récupérer l'énergie stockée dans les molécules de NADH et de FADH₂ (soit 38 molécules d'ATP) (Prescott *et al.*, 2013). La chaîne de transfert des électrons de la phosphorylation oxydative chez les organismes eucaryotes est formée de quatre complexes protéiques (complexe I, II, III et IV) qui sont incorporés dans la membrane de la mitochondrie (Joseph-Horne *et al.*, 2001; Cecchini, 2003; Briere *et al.*, 2006). Dans certains cas, comme chez les *Archea*, la chaîne de transfert des électrons de la phosphorylation oxydative est très semblable à celle retrouvée dans la membrane mitochondriale des organismes eucaryotes. Dans la majorité des cas, la chaîne de transfert des électrons des organismes procaryotes est assez différente de celle des organismes eucaryotes. Celle-ci peut comprendre un nombre de complexes différents, être ramifiée et/ou plus courte et elle est introduite dans la membrane

cytoplasmique et les protons se déplacent ainsi entre le cytoplasme de la cellule et l'espace périplasmique (Prescott *et al.*, 2013). Malgré les différences entre les chaînes de transfert de électrons, celles-ci reposent sur les mêmes principes fondamentaux élaborés selon la théorie chimiosmotique du biochimiste Peter Mitchell (1961). La théorie chimiosmotique explique que le transfert des protons de part et d'autre d'une membrane génère un potentiel électrochimique auteur de la production d'énergie (ATP) (Mitchell, 1961).

Généralement, chez les organismes procaryotes, le complexe I est formé des enzymes NADH : quinone oxidoréductase et de NADH deshydrogénase. Le complexe I est constitué de 14 sous-unités protéiques différentes (le nombre minimal requis pour être fonctionnel) nommées NuoA à N qui forment les différentes enzymes. Sept de ces sous-unités font face au cytoplasme bactérien et sont munis d'une flavine mononucléotide (FMN) ainsi que de cofacteurs soufre/fer. Les sept sous-unités hydrophobes restantes ne sont pas munis de cofacteurs, mais elles ont un rôle à jouer dans la liaison des quinones en plus de la translocation des protons H^+ (Mathiesen et Hägerhäll, 2003). Ainsi, les enzymes (NADH : quinone oxidoréductase et NADH deshydrogénase) catalysent l'oxydation du NADH en NAD^+ et la réduction de la quinone en quinol selon la réaction suivante : $NADH + Q + 5H_n^+ \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H_p^+$ (où Q représente la quinone et $5H_n^+$ ainsi que $4H_p^+$ représente les protons retrouvés du côté face négative et de la face positive de la membrane cytoplasmique) (Thorsten et Dierk, 2000). Cette réaction enzymatique permet la libération de plusieurs protons (H^+) et elle est couplée à un pompage d'ions H^+ de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. La force proton-motrice générée par la différence électrochimique entre la paroi externe et interne de la membrane cytoplasmique va alimenter une ATP synthase (incorporée aussi dans la membrane cytoplasmique) afin

de produire de l'ATP selon la réaction suivante: $\text{PO}_4^- + \text{ADP} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$. (Fernie *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2011; Berg *et al.*, 2013).

1.4.2 Les intermédiaires du cycle TCA et les autres sources de carbone consommées par *Frankia* spp.

Les sources de carbone consommées par les bactéries du genre *Frankia* peuvent être de nature très diversifiées. En effet, ces dernières ont la capacité d'utiliser des intermédiaires du cycle TCA, comme le sodium succinate hexahydrate ou encore d'utiliser des acides gras à courte chaîne, comme le propionate et l'acétate (Schwintzer Tjepkema, 2012). Des enzymes spécialisées (l'isocitrate lyase et la malate synthase) sont nécessaires pour métaboliser l'acétate dans le cycle du glyoxylate. Dans le milieu de croissance usuellement utilisé dans le laboratoire du Pr Sébastien Roy, le BAP (supplémenté de 5 g/L de sodium succinate hexahydrate) (Igual et Dawson, 1999), les bactéries utilisent le propionate de sodium et le sodium succinate hexahydrate comme source de carbone. Les enzymes du cycle du glyoxylate sont alors réprimées, dû à l'absence d'acétate (Akkermans *et al.*, 1983). De plus, les souches de *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a utilisent les propionate de sodium et sodium succinate pour leur croissance. En l'absence de l'une ou l'autre de ces sources de carbone, la croissance est absente. Par ailleurs, des analyses en chromatographie liquide à haute pression de surnageants de culture de *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a démontrent que ces souches utilisent respectivement le propionate de sodium et le sodium succinate de façon préférentielle (S.Roy, données non-publiées).

Des observations faites par Blom (1981), Harkink (1981) et Lechevalier (1983) avaient décrits l'incapacité de certaines souches de *Frankia* à transporter et à utiliser certaines sources de carbone. Ainsi, une classification des souches de *Frankia* était nécessaire afin de regrouper les souches qui avaient des caractéristiques communes en ce qui concerne l'utilisation des sources de carbone. Lechevalier (1984) a proposé une division des souches de *Frankia* en deux groupes distincts basés sur l'homologie génétique des souches, leur sérologie et leur physiologie (Baker *et al.*, 1981; Lechevalier, 1983; An *et al.*, 1985). Dans le groupe de type A, les souches que l'on y retrouve sont capables de croître dans un milieu qui contient plusieurs sources de monosaccharides et de disaccharides (Lechevalier *et al.*, 1983; Schwintzer Tjepkema, 2012). Ce groupe comprend, entre autre, les souches de *Frankia* Eul1b, G₂, Ptl1 et Airl2 (Lechevalier *et al.*, 1983). Les souches qui font partie du groupe B sont physiologiquement peu actives et elles utilisent des carbohydrates, des protéines et de l'amidon comme source de carbone (tel que le Tween et les acides organiques) (Blom, 1982; Schwintzer Tjepkema, 2012). Ce groupe comprend, entre autre, les souches de *Frankia* Arl3, Airl1, Avsl2, Avsl2, Cpl1 et MPI1 (Lechevalier *et al.*, 1983). Une des explications possible de la différence entre les microorganismes se trouvant dans le groupe A versus ceux du groupe B est que les organismes de groupe A possèdent un système actif de transport des carbohydrates. Par ailleurs, les microorganismes du groupe B démontrent une croissance plus importante lorsque du Tween 80 est ajouté à un milieu de culture contenant du glucose. Il semblerait que ce soit le caractère aliphatique du Tween 80 qui facilite le transport des molécules de glucose dans les cellules.

Par ailleurs, Blom (1982) a établi chez les souches de *Frankia* sp. Avcl1, Cpl1 et Ag+1, lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu de culture contenant seulement du glucose, du lactate, du sodium succinate hexahydrate ou de l'éthanol, qu'elles ne

démontraient que très peu ou pas de croissance. Par ailleurs, les trois souches de *Frankia* étudiées montraient une croissance appréciable dans les milieux contenant du Tween 80, de l'acétate de sodium et du Tween 80 combiné aux hydrolysats de caséine, à l'acide aspartique et à l'alanine, comme seule source de carbone (Blom, 1982). Ceci permettait de croire que ces souches appartenaient au groupe B de la classification établie par Lechevalier (1984). Dans un deuxième temps, Blom (1982) a prouvé que l'utilisation du sodium succinate hexahydrate comme seule source de carbone chez *Frankia* sp. Avcl1 ne permettait pas la croissance de cette souche, probablement en raison d'une incapacité à assimiler cette source de carbone. Par contre, *Frankia* sp. Avcl1 est en mesure d'utiliser l'acétate, le propionate de sodium et un mélange d'acétate et de sodium succinate hexahydrate comme source de carbone (Blom, 1982).

Dans une autre mesure, *Frankia* sp. utilise, sous forme de réserve, le glycogène (Dawes et Senior, 1973) ainsi que le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) (Lopez *et al.*, 1984; Schwintzer, 2012). Le tréhalose est décrit comme étant la principale réserve énergétique retrouvée dans les spores de nombreux actinomycètes, dont *Streptomyces griseus*. En effet, les spores qui ne sont pas en germination utilisent le tréhalose très lentement contrairement à une utilisation très rapide de ce dernier lorsque les spores sont en germination (McBride et Ensign, 1987).

1.5 Les stress tolérés par *Frankia* spp.

Les microorganismes sont exposés à de nombreux stress au cours de leur existence et pour réussir à survivre dans des environnements en perpétuel changement, les microorganismes doivent être, soit résistants à certains stress, ou être en mesure de lutter contre ces derniers (Boor, 2006). Par exemple, les organismes filamenteux comme *Frankia* spp. et *Streptomyces* spp. peuvent faire face aux privations en nutriments. Leur morphologie filamenteuse fait en sorte qu'ils peuvent réussir à capter des nutriments que les autres microorganismes ne pourraient pas obtenir (Young, 2006). *Streptomyces* spp. est un microorganisme dont la niche écologique est le sol. Ainsi, il doit répondre à de nombreux stress environnementaux, par exemple, en modifiant son taux de croissance et sa physiologie. La croissance de ce microorganisme en laboratoire se caractérise par une forte et rapide croissance du mycélium végétatif, puis par une interruption de la croissance. Durant cet arrêt, les microorganismes s'adaptent à la présence de produits toxiques, tel que les acides organiques, produit durant la croissance du mycélium végétatif. Puis, une fois adapté, les microorganismes permettent la croissance du mycélium aérien (Voillier *et al.* 2003).

Frankia spp. est un microorganisme qui vit également dans le sol de façon libre ou en symbiose avec de nombreuses espèces de plantes (plus de 220). Ce dernier est donc sujet à de nombreux stress environnementaux comme la limitation des nutriments ainsi que la présence potentielle de nombreux éléments chimiques et osmotiques tels que les métaux lourds, des acides et des sels (Benson et Silvester, 1993; Clemente et Fedorak, 2005; Haferburg et Kothe, 2007; Chaia *et al.*, 2010).

De nombreux travaux ont été effectués dans le but de connaître les tolérances de *Frankia* face à de nombreux stress. Dans un premier temps, les travaux de Bélanger (2010) ont permis de mettre en lumière la tolérance de *Frankia* spp. en symbiose avec l'aulne vis-à-vis différents métaux. Parmi ces métaux, la tolérance de *Frankia* spp. a été observée envers ceux présentant une toxicité aiguë (le cadmium, le cobalt, le cuivre, le chrome, le nickel et le zinc), une toxicité modérée (l'aluminium, le plomb et le vanadium) et ceux ayant une faible toxicité (arsenic, magnésium et molybdate). Une partie de cette étude avait pour but de déterminer si la symbiose de *Frankia* spp. avec l'aulne permettait à la plante de survivre dans des sites miniers perturbés par les métaux lourds. Ils ont pu conclure que la symbiose était sensible à l'aluminium et que le nickel semblait stimuler l'établissement de la symbiose. Les autres métaux testés n'avaient pas d'impact sur la symbiose. Dans un second temps, les travaux de Mallet (2011) ont permis de mieux comprendre la tolérance de différentes souches de *Frankia* face à l'alcalinité, la salinité, le Na_2SO_4 ainsi que les sels et acides naphténiqes. Des quatre souches de *Frankia* testées (ACN10a, ACN14a, Avcl1 et Cj1-82), c'est la souche ACN14a qui présentait une plus grande tolérance au NaCl et au Na_2SO_4 . Pour ce qui est des sels et des acides naphténiqes, les souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 étaient les plus tolérantes. Finalement toutes les souches testées présentaient une tolérance égale face à l'alcalinité (Mallet et Roy, 2014). Dans un troisième temps, les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) ont permis d'établir un milieu de culture BAPS qui permettait la différenciation en hyphe toruleux de la souche *Frankia alni* ACN14a. Ce milieu de culture est caractérisé par une concentration en KH_2PO_4 de 50 mM, soit 5 fois la concentration normalement retrouvée dans les milieux de culture BAPS utilisés pour la croissance de ce microorganisme (Igual et Dawson, 1999). La présence d'une aussi grande concentration de KH_2PO_4 entraîne une diminution de pH de presque une unité comparativement au milieu de culture BAPS régulier (Igual et Dawson, 1999). Ce milieu de culture n'est pas utilisé pour la prolifération cellulaire de *Frankia alni*

ACN14a, mais plutôt pour sa différenciation en hyphes toruleux et il présente un taux de mortalité important des cellules, soit d'environ 30 à 40 %. Il est important de noter qu'une proportion de cellules réussit à survivre dans ce milieu stressant sous forme d'hyphes toruleux (Bernèche D'Amours, 2012). *Frankia* spp. est pour ainsi dire un organisme présentant de nombreuses tolérances face à divers métaux, salinité, alcalinité, sels et acides naphthaléniques ou choc osmotique. Il est logique que les microorganismes du genre *Frankia* soient en mesure de vivre dans le sol puisqu'ils sont capables de tolérer de nombreux stress environnementaux.

1.6 Les hypothèses et les objectifs du mémoire

Les hyphes toruleux sont présents, en petite quantité, dans la très grande majorité des cultures de *Frankia alni* ACN14a. En ce qui a trait à leur morphologie et leurs fonctions potentielles, ces derniers n'ont été décrits qu'une seule fois par Diem et Dommergues (1985). Jusqu'à tout récemment, aucune autre étude n'avait été publiée sur ce type de morphologie puis les travaux de recherche de Bernèche-D'Amours (2012) ont permis d'établir un milieu de culture permettant de produire de façon massive les hyphes toruleux (jusqu'à 100 % des cellules vivantes différenciées en RTH). Ce milieu de culture a permis d'ouvrir la voie vers l'obtention d'hyphes toruleux et leur étude fondamentale. Mon travail de recherche s'inscrit comme étant un projet visant à approfondir les connaissances sur les rôles potentiels que les hyphes toruleux pourraient avoir. Ma première hypothèse est que l'âge relatif d'une culture de *Frankia alni* ACN14a peut influencer la différenciation en hyphes toruleux. Dans cette hypothèse, des expériences ont été faites afin de déterminer si l'état physiologique des cellules, avant une expérience (pré-inoculum), a une influence sur le patron de différenciation en RTH lorsque l'échelle de culture est un erlenmeyer de 125 ml et un

bioréacteur de 2,2 l. Dans l'hypothèse 2, la différenciation en RTH pourrait dépendre de la concentration en propionate de sodium appliquée en fonction des divers agents inducteurs chimiques et physique. Ainsi, des essais en microplaques ont été faits afin de tester diverses combinaisons de 50 mM de propionate de sodium combinées à divers agents inducteurs physiques (différentes concentrations de biomasse au départ et différents temps d'incubation) et d'agents inducteurs chimiques (KH_2PO_4 , KCl, acide citrique). Ces essais permettront de mieux cibler les combinaisons d'agents inducteurs qui pourraient potentiellement induire massivement le morphotype RTH sans entraîner une mortalité aussi importante que celle occasionnée par le milieu modifié de Bernèche-D'Amours (2012). Les résultats obtenus permettraient de découvrir de nouvelles combinaisons d'agents inducteurs qui induisent massivement le morphotype RTH et qui pourraient être appliqués en bioréacteur de 2,2 l afin de produire à grande échelle ce morphotype. Enfin, dans l'hypothèse 3, les paramètres appliqués lors de la fermentation pourraient influencer la différenciation en RTH. Pour ce faire, des essais en bioréacteurs, où la concentration d'oxygène dissout a été modulée afin de créer un environnement propice à l'induction des hyphes toruleux, ont été faits.

CHAPITRE 2: IMPORTANCE DE L'ÂGE RELATIF D'UNE CULTURE DE *FRANKIA* *ALNI* ACN14A SUR SA CAPACITÉ DE DIFFÉRENCIATION EN HYPHES TORULEUX

Le chapitre 1 sera présenté sous forme d'article. Ce dernier présente certains résultats que j'ai obtenus durant ma maîtrise. Il sera traduit puis soumis tel quel dans le Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.

2.1 Références de l'article

Importance de l'âge relatif d'une culture de *Frankia alni* ACN14a sur sa capacité de différenciation en hyphes toruleux

Vanessa Gagnon¹ et Sébastien Roy^{1*}

¹ Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 Blvd de l'Université, Sherbrooke, Qc, J1K 2R1, Canada.

*Auteur pour la correspondance

Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 Blvd de l'Université, Sherbrooke, Qc, J1K

2R1, Canada. Tel : +1 819 821 8000 extension 62505; Fax : + 1 819 821 8049;
E-mail : Sebastien.Roy@USherbrooke.ca

2.2 Contribution des auteurs

La répartition des tâches s'est faite comme suit, j'ai réalisé la totalité des manipulations présentées. Par ailleurs, j'ai aussi fait l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article. De plus, Sébastien Roy a aussi participé à l'analyse des résultats, en plus de contribuer à la conception et à la révision de ce manuscrit.

2.3 Apport et originalité de l'article pour la science

Frankia sp. est un microorganisme peu étudié et peu connu dans la littérature. À l'instar de nombreux autres microorganismes, ce dernier présente de nombreuses morphologies. Parmi celles-ci, les hyphes toruleux («*Reproductive Torulose Hyphae*») représentent la structure la moins étudiée. Les résultats présentés dans cet article explorent fondamentalement ces structures et mettent davantage en lumière l'induction des hyphes toruleux (RTH) en milieu BAPS modifié, un milieu développé au laboratoire qui permet l'induction des RTH (Igual and Dawson, 1999; Bernèche-D'Amours, 2012). Il n'a jamais été proposé, dans la littérature, que l'induction des hyphes toruleux soit dépendante de l'âge relatif du pré-inoculum. Dans mes travaux, j'ai démontré que lors de la phase de croissance exponentielle des cellules, autant à l'échelle d'ermenmeyer de 125 ml qu'à l'échelle d'un bioréacteur de 2,2 l, que

l'induction en hyphes toruleux était beaucoup plus difficile lorsque les cellules se trouvaient dans la phase exponentielle de croissance. Mes expériences ont regroupé plusieurs techniques de microscopie (épifluorescence et électronique à transmission) en plus d'utiliser le bioréacteur comme outil de croissance. Cela représentait une difficulté majeure dans mon projet puisque les conditions de culture en bioréacteur sont très différentes de celles en erlenmeyer. En plus de préciser que l'induction des RTH ne se produit pas ou très peu dans la phase de croissance exponentielle des cellules, mes travaux ont ouvert la porte aux essais d'induction d'hyphes toruleux avec de nombreuses autres souches de *Frankia* sp. (tels que *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1). Jusqu'à maintenant, ces souches n'ont jamais présentées le morphotype RTH avec le milieu d'induction BAPS modifié élaboré par Bernèche-D'Amours (2012) (Lafond-Lambert, 2014). Par contre, grâce à mes recherches, il se pourrait que l'âge relatif du pré-inoculum chez ces souches soit tout simplement inadéquate pour permettre la différenciation en RTH. Ainsi, les cellules pourraient être induites moyennant un état physiologique du pré-inoculum approprié.

2.4 Article

Résumé

La souche *Frankia alni* ACN14a a été isolée à Tadoussac (Québec, Canada) à partir d'un nodule d'un aulne crispé. Ce microorganisme possède quatre types de morphologies, les hyphes végétatifs, les sporanges, les vésicules et les hyphes toruleux («*Reproductive Torulose Hyphae* »). Ces derniers n'ont été décrits qu'une

seule fois dans la littérature par Diem et Dommergues (1985). Bernèche-D'Amours (2012) a mis au point un milieu de culture BAPS modifié (5x KH₂PO₄, pH 5,85) qui permet la différenciation massive en hyphes toruleux (RTH). Cependant, quelques fois, l'utilisation de ce milieu de culture n'induisait aucune différenciation en RTH. Des essais en erlenmeyer de 125 ml et en bioréacteur de 2,2 l ont été réalisés afin de déterminer si l'âge relatif et par le fait même l'état physiologique du pré-inoculum avait un impact sur la capacité des cellules à se différencier en RTH. Il s'est avéré, autant en erlenmeyer qu'en bioréacteur, que l'induction en RTH ne se produisait pas ou très peu lors de la phase de croissance exponentielle des cellules, mais qu'elle se produisait plutôt dans la phase stationnaire. Cette différence pourrait être attribuée à un régime métabolique qui pourrait être trop rapide durant la phase exponentielle de croissance. L'utilisation de l'âge relatif approprié d'une pré-culture est primordiale pour induire une différenciation en RTH lorsque les cellules sont plongées en milieu BAPS modifié pour l'induction.

Mots clés : hyphes toruleux, RTH, *Frankia alni* ACN14a, âge relatif, différenciation cellulaire

Introduction

Frankia sp. est une actinobactérie filamenteuse du sol qui peut établir une symbiose avec plus de 220 espèces de plantes appartenant à huit familles comprenant 3 ordres, les Curcubitales, les Fagales et les Rosales (Benson et Silvester, 1993; Bassi et Benson, 2007; Chaia *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2011). *Frankia* sp. possède quatre types de morphologie : les hyphes végétatifs, qui représentent le mode de croissance de la bactérie; les sporanges, qui sont des sacs contenant les spores

responsables de la dissémination du microorganisme et les vésicules, qui permettent la fixation de l'azote (N₂) atmosphérique (Benson et Silvester, 1993; Berry *et al.*, 1993; Krumholz *et al.*, 2003). Un quatrième type de morphologie a été décrit par Diem et Dommergues (1985), les RTH (« *Reproductive Torulose Hyphae* »). Ces structures ont pour la première fois été observées chez la souche *Frankia* sp. Cj1-82, isolée de nodules de *Casuarina junghuhniana*, puis elles ont par la suite été observées chez les souches de *Frankia* sp. CeF1-82, CeD1-82, FCc64, FCe33 et FMr43 (Diem et Dommergues, 1985; Xie, 2009). Diem et Dommergues (1985) ont proposé que les hyphes toruleux pourraient être des structures impliquées dans la survie et la reproduction du microorganisme. Ces cellules ont un aspect bombé et présentent une paroi plus épaisse que celle des hyphes réguliers en plus d'être caractérisées par une septation très abondante de l'hyphe (Diem et Dommergues, 1985; Bernèche-D'Amours, 2012).

Plusieurs microorganismes possèdent une morphologie qui ressemble au morphotype toruleux observé chez la souche de *Frankia* sp. Cj1-82 par Diem et Dommergues (1985). Par exemple, *Streptomyces aureofaciens* et *Penicillium chrysogenum* produisent un mycélium qui se fragmente pour produire des chaînes de spores (impliquées dans la survie et la dissémination) pouvant s'apparenter au morphotype toruleux (Tresmerh *et al.*, 1967 ; Amanullah *et al.*, 2000). De plus, Tresmerh *et al.* (1967) ont observé que la quantité d'inoculum de départ influence la fragmentation de l'hyphe. Un inoculum plus concentré au départ augmente considérablement la fragmentation de l'hyphe qui présente alors une septation aussi abondante que celle retrouvée chez le morphotype toruleux de *Frankia* sp. Cj1-82. Il a aussi été montré chez plusieurs souches de *Streptomyces* spp. que la quantité de spores dans l'inoculum de départ influence le morphotype, une grande concentration de spores dans l'inoculum de départ va produire des agrégats de mycélium tandis

qu'une faible concentration de spores va mener à la formation d'agrégats compact chez le microorganisme (Lawton *et al.*, 1989).

Les hyphes toruleux sont observés normalement en milieu de culture chez la souche *Frankia alni* ACN14a, mais en faible proportion (Bernèche-D'Amours 2012). Ce type de morphologie a fait l'objet de très peu d'étude, jusqu'en 2012, où Bernèche-D'Amours a mis au point un milieu de culture modifié permettant la différenciation en hyphes toruleux. Dans ce milieu de culture BAPS, la concentration en KH_2PO_4 est augmentée à 50 mM (Igual et Dawson, 1999; Bélanger *et al.*, 2011; Bernèche D'Amours, 2012). Ce milieu induit la différenciation massive en RTH, mais seulement lorsque les microorganismes sont présents à une faible concentration protéique. De plus, dans certaines expériences l'induction des RTH était inexistante. Afin d'étudier fondamentalement les rôles du morphotype toruleux, il est nécessaire de produire en grande quantité ce type cellulaire. Pour ce faire, il est primordial de bien comprendre le lien entre la différenciation en hyphes toruleux et la cinétique de croissance de *Frankia alni* ACN14a. À différentes échelles de cultures (microplaques 96 puits, erlenmeyers et bioréacteur de 2,2 l) et avec l'ajout de différents agents inducteurs, nous évaluerons si la cinétique de croissance de *Frankia alni* ACN14a peut influencer son patron de différenciation en RTH. Ainsi, dans des travaux futurs, il sera possible d'induire la différenciation massive en RTH, en bioréacteur de 2,2 l, au moment opportun de la croissance et ainsi générer une grande quantité de RTH pour les rendre disponibles pour la recherche fondamentale.

Matériel et méthodes

Souche de *Frankia* et conditions de croissance

La souche bactérienne *Frankia alni* ACN14a (ULQ0102014010) provient de la collection du Pr. Maurice Lalonde du Centre d'étude de la forêt de l'Université Laval (Normand et Lalonde, 1982). La souche a été cultivée en milieu BAPS pH 6,70 (Bélanger *et al.*, 2011), à 30 °C, sans agitation pendant 14 jours. La viabilité des cultures a été évaluée par microscopie à épifluorescence. Un ml de cellules non homogénéisées a été récolté et concentré par une brève centrifugation. Puis, 20 µl de ces cellules concentrées ont été mélangées à 20 µl de colorant LIVE/DEAD® *BacLight™ Bacterial viability kit* concentré 1x (Life Technologies, Carlsbad, CA). Le mélange a été incubé 15 minutes à la température pièce. Puis, 20 µl de cellules colorées ont été déposés entre lame (Superfrost® Plus, Fisher scientific company, Ottawa, ON) et lamelle (Fisherfinest™ Premium cover glass, Fisher scientific company, Ottawa, ON) pour une observation avec le microscope à épifluorescence inversé (Olympus 1X70, Olympus canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada). Les photos ont été prises avec la caméra monochrome CoolSNAP-Pro. Finalement, les images ont été traitées avec le programme informatique Image Pro Plus version 5.1 (Media Cybernetics, San Diego, CA).

Pour produire l'inoculum, les cellules ont été lavées deux fois avec 45 ml de saline 0,85 % stérile. Chaque lavage a été entrecoupé d'une centrifugation à 3440 x g, 10 minutes à 4 °C. Après la dernière centrifugation, les bactéries ont été resuspendues dans 20 ml de saline, puis elles ont été homogénéisées avec une seringue de 10 ml

munie d'une aiguille de 18G x 1 ½ comme décrit précédemment (Bélanger *et al.*, 2011). Afin d'inoculer les milieux de culture à des concentrations protéiques connues, la méthode de Bradford a été utilisée pour le dosage de la quantité de protéines, comme décrit dans Bélanger *et al.* (2011). Brièvement, 1 ml de cellules homogénéisées a été ajoutés à 1,4 g de billes de type ZY, Zirconia/Yttrium de 0,6 mm à 0,8 mm (Sigmund Linder, Wasmensteinach, Germany). Les cellules ont été lysées avec un FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) pour 6 traitements de 15 secondes à 6,5 m/s. Le réactif Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) a été utilisé pour permettre le dosage protéique. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 595 nm par un spectrophotomètre Ultrospec 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, New Englet). Selon les expériences, certains erlenmeyers ont étéensemencés à 7,5 µg de protéines/ml et d'autres à 15 µg de protéines/ml en milieu BAPS.

Le bioréacteur (BioFlo 115, New Brunswick Scientific Co., Inc, Allemagne) contenait 2 l de BAPS régulier à un pH de 6,70 et il a étéensemencé à 15 µg de protéines/ml. Les paramètres utilisés pour la croissance des microorganismes sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Paramètres utilisés pour la croissance de *Frankia alni* ACN14a en bioréacteur (BioFlo 115, New Brunswick scientific Co., Inc, Allemagne) de 2,2 l

Paramètres	Valeur
Température (°C)	30
Agitation (RPM)	150
Unité de pH	6,70
Oxygène dissout (%)	80
Flux d'oxygénation (l/min)	2
Ajout	Aucun

Pour induire la différenciation en hyphes toruleux le milieu de culture BAPS a été modifié par l'augmentation de la concentration du KH_2PO_4 à 50 mM (10 mM dans le milieu BAPS régulier), ce qui a entraîné une chute du pH à 5,85 (celui-ci n'a pas été ajusté). Les cultures ont été ensemencées dans ce milieu à 5 μg de protéines/ml (en erlenmeyer) ou à 15 μg de protéines/ml (en microplaques) et incubées 2 semaines à la température pièce sans agitation (Bernèche-D'Amours, 2012).

Essais d'induction d'hyphes toruleux à l'échelle erlenmeyer de 125 ml avec *Frankia alni* ACN14a

Douze erlenmeyers de 125 ml contenant 50 ml de milieu BAPS régulier, ont été inoculés à 7,5 μg de protéines/ml et douze autres ont été inoculés à 15 μg de protéines/ml et ont été incubés à 30 °C, de façon statique et à l'abri de la lumière. Ces erlenmeyers constituent le pré-inoculum. Aux jours de croissance 0 (contrôle +), 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 34 et 37, la totalité de la culture d'un erlenmeyer a été

décantée dans un tube de 50 ml puis centrifugée une seule fois à 3440 x g, 10 minutes, à 4 °C. Le culot a par la suite été resuspendu dans 25 ml de saline 0,85 % stérile. Un échantillon a été prélevé pour vérifier la viabilité cellulaire en microscopie à épifluorescence grâce au colorant *LIVE/DEAD®*, puis le reste de la culture a été homogénéisée 10 fois avec une seringue de 18G x 1 ½. La concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford. Par la suite, un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de BAPS modifié (Bernèche-D'Amours, 2012) a été inoculé à 5 µg de protéines/ml, puis incubé durant 2 semaines à température pièce, à l'abri de la lumière et de façon statique (Figure 1). Après 2 semaines, un échantillon a été prélevé pour vérifier la présence d'hyphes toruleux en microscopie à épifluorescence grâce au colorant *LIVE/DEAD®*.

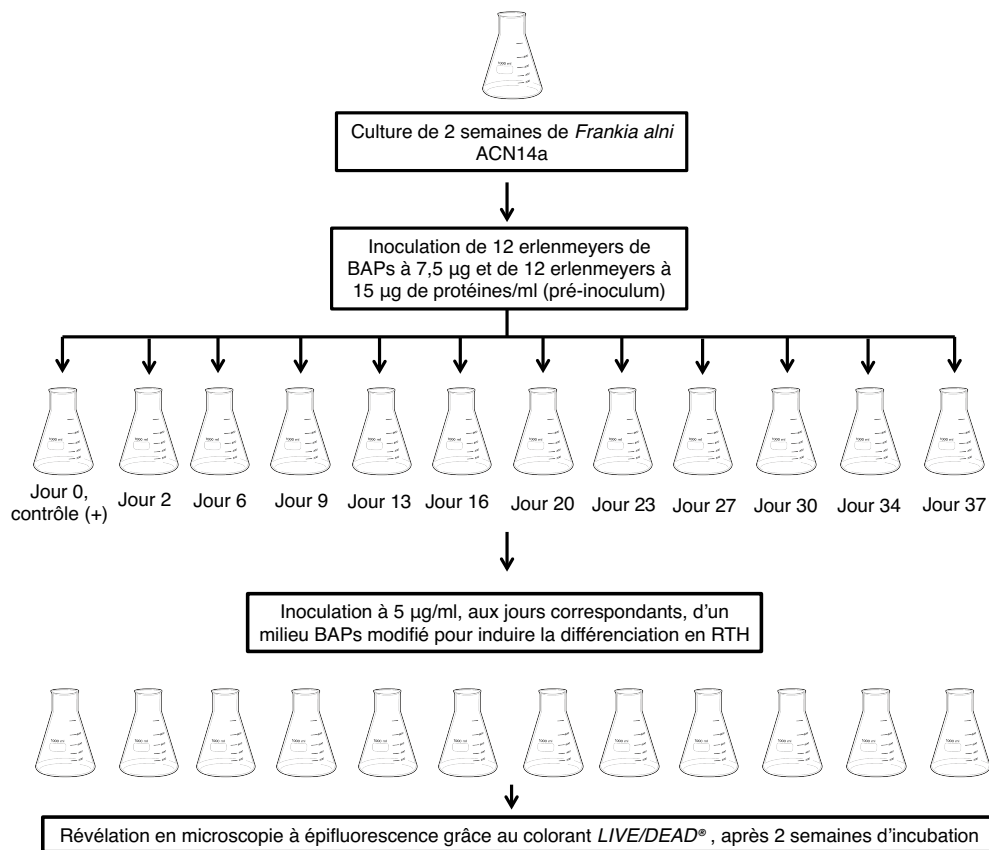


Figure 1 : Schématisation de l'expérience d'induction d'hyphes toruleux à l'échelle d'erlenmeyer de 125 ml.

Essais d'induction d'hyphes toruleux à partir d'une culture de *Frankia alni* ACN14a cultivée en bioréacteur de 2,2 l

Suite à l'inoculation du bioréacteur avec *Frankia alni* ACN14a à 15 µg de protéines/ml, des prélèvements ont eu lieu aux jours 0 (contrôle +), 3, 5, 7, 10, 12 et 14. À chacun de ces jours, un prélèvement de 50 ml a été fait de façon stérile dans le bioréacteur et la culture a été centrifugée une fois à 3440 x g, 10 minutes à 4°C, puis resuspendue dans 25 ml de saline 0,85 % stérile. Les protéines ont été dosées selon

la méthode de Bradford. Ces prélèvements ont servi à inoculer chacune des 3 parties de l'expérience (partie A, B et C) (Figure 2).

Partie A : Les microplaques ont été préparées tel que décrit dans Bélanger *et al.* (2011). En bref, 100 µl de milieu BAPS 2x, 50 µl de solutions inductrices (Tableau 2), et finalement 50 µl d'inoculum concentré à 60 µg de protéine/ml ont été ajoutés aux puits, pour un volume final de 200 µl (concentration finale d'inoculum de 15 µg de protéines/ml). Une colonne de la microplaque n'a pas été inoculée avec *Frankia alni* ACN14a mais avec de la saline 0,85 %, cette colonne a servi de contrôle négatif.

Partie B : À chacun des jours de prélèvements dans le bioréacteur, un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de BAPS modifié a été inoculé à 5 µg de protéines/ml (Bernèche-D'Amours, 2012). Afin d'évaluer la différenciation en hyphes toruleux dans le temps, 1 ml a été récolté stérilement aux jours 4, 8, 14 et 20 post-inoculation des erlenmeyers, pour être analysé en microscopie à épifluorescence grâce à la coloration *LIVE/DEAD®*.

Partie C : À chacun des jours de prélèvement un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de BAPS a été inoculé à 15 µg de protéines/ml. À différents jours de croissance (jours d'inoculation dans l'erlenmeyer de 125 ml de BAPS + 4, 8, 14 et 20), 5 ml ont été prélevés, puis centrifugés (à 3440 x g, 10 minutes, à 4 °C) et resuspendus dans 5 ml de saline 0,85 % stérile. À partir de cette suspension, les microplaques ont été préparées comme suit: 100 µl de BAPS modifié 2x (Bernèche-D'Amours, 2012), 50 µl d'eau distillée stérile et 50 µl d'inoculum concentré à 60 µg de protéine/ml ont été ajoutés aux puits, pour un volume final de 200 µl. Une colonne de la microplaque n'a

pas été inoculée avec *Frankia alni* ACN14a, mais avec de la saline 0,85 %, cette colonne a servi de contrôle négatif. Les microplaques ont été incubées, en conditions saturantes d'humidité, à la température pièce et à l'abri de la lumière durant 2 semaines. Après 2 semaines (post-inoculation des microplaques), les puits devant être observés ont été prélevés et observés en microscopie à épifluorescence grâce à la coloration *LIVE/DEAD®*.

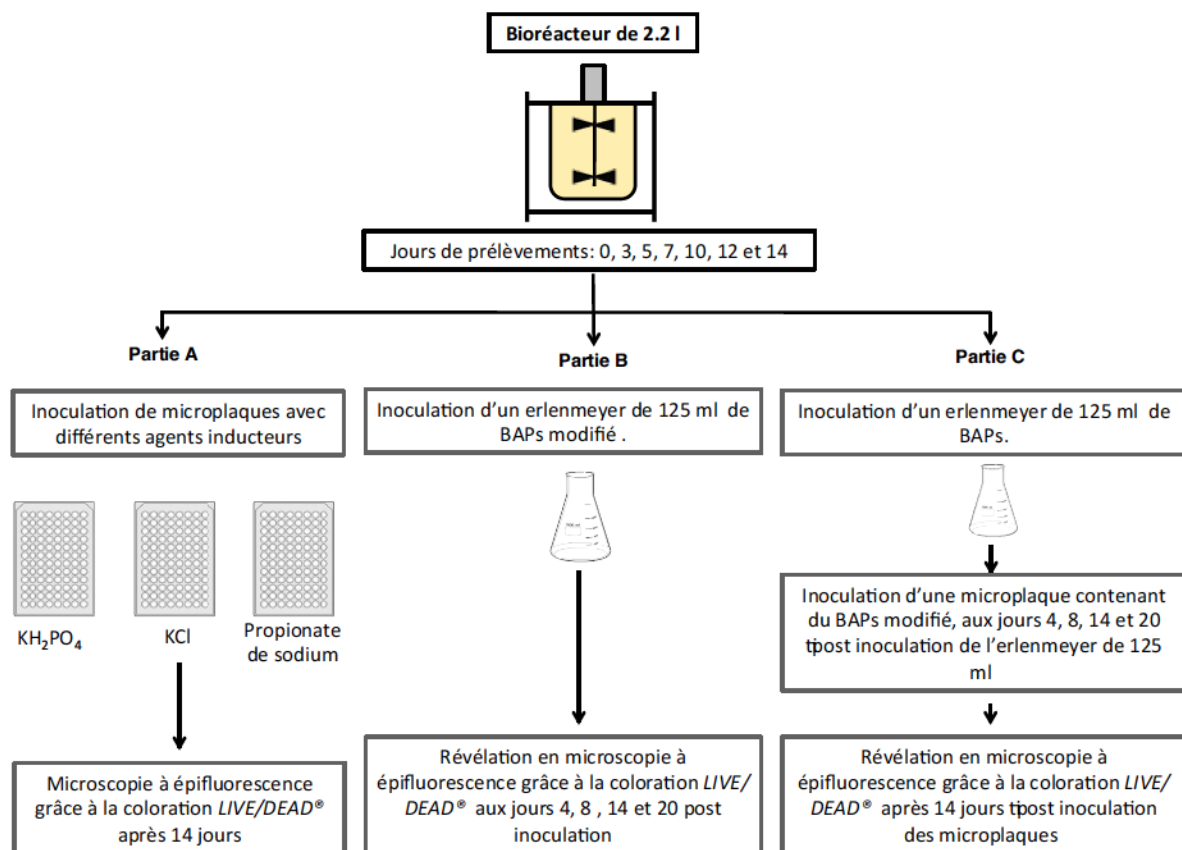


Figure 2: Schématisation de l'expérience d'induction des hyphes toruleux à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l.

Tableau 2: Présentation des conditions inductrices utilisées pour l'expérience d'induction d'hyphes toruleux à l'échelle d'un bioréacteur de 2,2 l.

Conditions inductrices	Concentrations finales étudiées (mM)
KH ₂ PO ₄	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
KCl	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
Propionate de sodium	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 et 60

Microscopie électronique à transmission

Pour l'observation en microscopie électronique à transmission, *Frankia alni* ACN14a à été inoculé à 15 µg de protéines/ml et cultivé 2 semaines (à 30°C pour les microorganismes cultivés dans le BAPS régulier et à TP pour tous les autres milieux de culture) dans les milieux présentés au tableau 3.

Tableau 3: Présentation des différents milieux de cultures utilisés pour produire les cellules observées en microscopie électronique à transmission.

Milieu de culture	pH	Mode de culture / volume de milieu	Référence(s)
BAPS régulier	6,70	Erlenmeyer de 1 l / 400 ml	(Igual et Dawson, 1999; Bélanger <i>et al.</i> , 2007)
BAPS modifié, 50 mM de KH ₂ PO ₄	5,85	Erlenmeyer de 1 l / 400 ml	(Bernèche- D'Amours, 2012)
BAPS régulier + 40 mM de KCl	5,85	Erlenmeyer de 1 l / 400 ml	(Lafond Lambert, 2014)
BAPS régulier + 50 mM de propionate de sodium	5,85	Microplaques / 200 µl	
BAPS régulier + 50 mM de KH ₂ PO ₄ et 50 mM de propionate de sodium	6,70	Microplaques / 200 µl	

Après 2 semaines d'incubation, les cellules ont été récoltées et concentrées en culot de 5 mm d'épaisseur. La fixation primaire consiste en une incubation des cellules dans 2 % glutaraldéhyde-4 % paraformaldéhyde-0,2 % d'acide tannique dans un tampon 0,1M cacodylate de sodium pH 7,4, durant 15 minutes. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à 8500 x g durant 2 minutes pour retirer le fixateur et 20 µl d'albumine 15 % ont été ajoutés. Une nouvelle centrifugation à 8 500 x g durant 2 minutes a permis d'enlever l'albumine et l'agent fixateur a été ajouté afin de recouvrir

les cellules. Les cellules ont été incubées 2 heures à la température pièce. Puis, 3 lavages ont été effectués avec le tampon cacodylate 0,1M. La fixation secondaire a été faite dans du tétroxyde d'osmium 1,5 % tamponné avec du cacodylate 0,1M pendant 4 heures à la température pièce. Les culots ont été décollés dans le fixateur, puis coupés en morceaux de 1 mm³ grâce à un ultramicrotome (LEICA ultracut UCT, Leica Microsystems, Allemagne). Ensuite, 3 lavages ont été effectués dans le tampon cacodylate 0,1M suivi de 3 lavages dans de l'eau du robinet. L'acétate d'uranyle 2 % a été utilisé pour faire la fixation tertiaire qui a duré 3 heures à la température pièce. Ensuite 3 lavages dans l'eau ont été faits. Une déshydratation graduelle dans l'éthanol 30 %-50 %-70 %-90 % et 100 % a été réalisée. Une fois les cellules fixées, elles ont été passées dans l'oxyde de propylène, puis enrobées dans de l'Épon 812 (Électron Microscopy Science, Pensylvannie) et polymérisées à 65°C durant 2 jours. Une fois refroidis, les blocs ont été coupés en tranches de 1 µm d'épaisseur grâce à un ultramicrotome. Ces tranches ont ensuite été colorées au bleu de toluidine (1 % du colorant dilué dans l'eau). Après une observation en microscopie optique, les blocs d'intérêts ont été coupés en tranche de 70 nm d'épaisseur grâce à un ultramicrotome, puis les tranches ont été collées sur une grille et finalement colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les lames ont été observées avec le microscope électronique à transmission H-7500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japon) (Bernèche-D'Amours, 2012).

Analyses statistiques

Les résultats relatifs aux mesures d'épaisseur des cellules, du septum entre les cellules ainsi que de la paroi et de la membrane plasmique consistaient en un test ANOVA suivi d'un test de multicomparaison de Tukey's. Les graphiques ont été

générés par le logiciel Graph Pad Prism 6 pour Mac OS X (Version 6.0d, GraphPad Software Inc, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Résultats

Production d'hyphes toruleux à l'échelle d'erlenmeyer de 125 ml

Lorsque le pré-inoculum a été inoculé à 15 µg de protéines/ml, en milieu BAPS modifié, on a pu observer une différenciation en RTH des cellules lorsqu'elles se trouvaient dans la phase stationnaire de croissance (Figure 3 C.). On a remarqué une faible différenciation en hyphes toruleux lorsque les cellules ont été récoltées lors des phase de latence et exponentielle de croissance (Figures 3 A. et B.). Dans ces phases, une petite proportion de cellules présentait des septations un peu plus abondantes qu'en milieu BAPS régulier, mais pas en assez grande quantité pour être considérés RTH. Par ailleurs, aucune différenciation en RTH ne se produisait lorsque les cellules ont été récoltées dans la phase de déclin (Figure 3 D.).

Lorsque le pré-inoculum a été inoculé à 7,5 µg de protéines/ml on peut observer des hyphes toruleux lorsque les cellules étaient prélevées dans la phase exponentielle et stationnaire de croissance dans le milieu BAPS modifié (Figures 3 F. et G.). Lorsque les cellules ont été prélevées dans la phase de latence (Figure 3 E.), ces dernières présentaient des renflements et des septations un peu plus abondantes que les hyphes végétatifs, mais qui ne sont toutefois pas caractéristiques des vrais hyphes toruleux. Aucune différenciation en RTH n'a été observée lorsque les cellules ont été

prélevées dans la phase de déclin (Figure 3 H.). Les courbes de croissances observées dans les erlenmeyers inoculés à 7,5 et 15 μg de protéines/ml sont présentées à l'annexe 1.

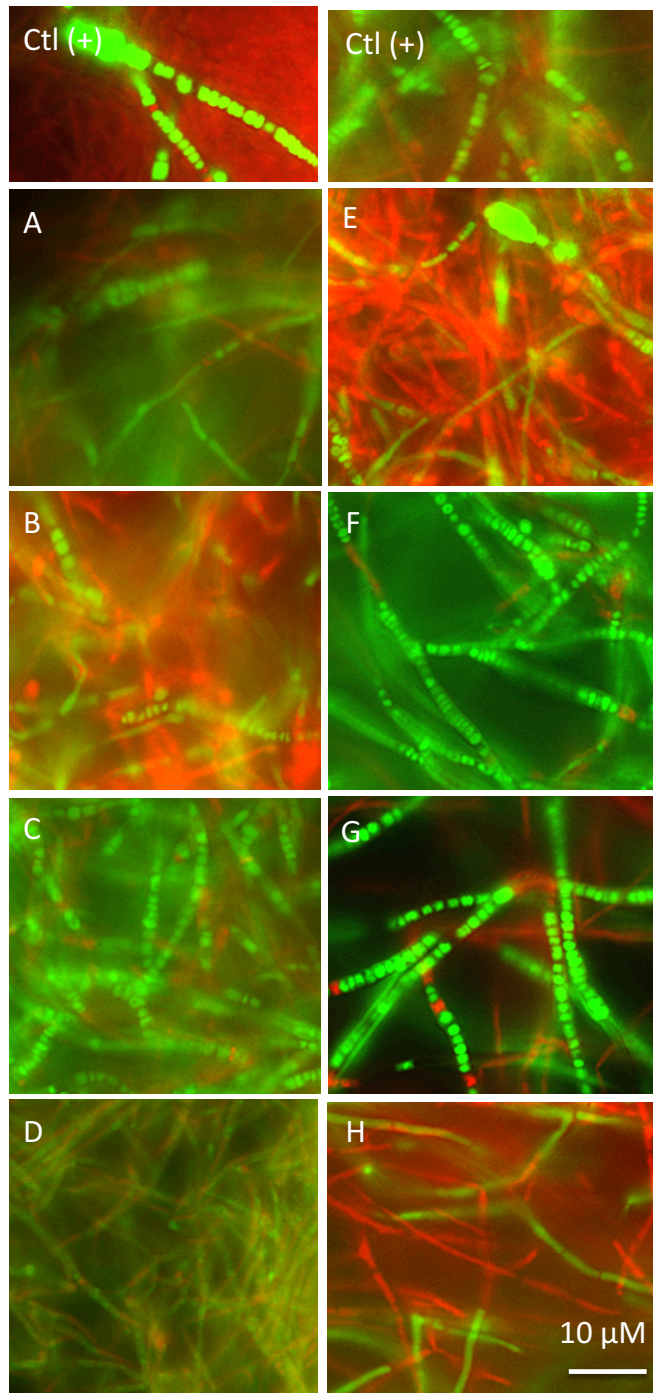


Figure 3 : Différenciation cellulaire des hyphes de *Frankia alni* ACN14a. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules de *Frankia alni* ACN14a colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®* après 14 jours de culture en milieu BAPS modifié. Les cellules ont été

inoculées à 15 µg (A. à D.) et 7,5 µg (E. à H.) de protéines/ml en milieu BAPS et ont été récoltées dans la phase de latence (A. et E.), dans la phase exponentielle de croissance (B. et F.), dans la phase stationnaire de croissance (C. et G.) et dans la phase de déclin (D. et H.), puis inoculées en milieu BAPS modifié (Bernèche-D'Amours, 2012). Le contrôle positif est représenté par des cellules cultivées à 15 µg de protéines/ml en milieu BAPS durant 14 jours puis inoculées à 5 µg de protéines/ml en milieu BAPS modifié (Bernèche-D'Amours , 2012).

Production d'hyphes toruleux à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l

Dans cette expérience nous voulions connaître le ou les moments où les cellules de *Frankia alni* ACN14a étaient inductibles en hyphes toruleux lorsqu'elles étaient cultivées préalablement en bioréacteur de 2,2 l. Dans un premier temps, la courbe de croissance révèle que la phase de latence se déroule du jour 0 au jour 3 et que la phase exponentielle de croissance s'étire du jour 3 au jour 7. Ensuite la phase stationnaire se déroule du jour 7 au jour 12 et finalement la phase de déclin du jour 12 au jour 14 (Figure 4). Comme décrit au tableau 4, dans la partie A de l'expérience, nous avons pu observer une différenciation en hyphes toruleux supérieure à 70 % se produisait seulement au jour 0 en présence des 3 types d'agents inducteurs (le propionate de sodium, le KH_2PO_4 , et le KCl). Dans une mesure de simplicité, seulement les résultats en présence de 50 mM de chacun des agents inducteurs ont été présentés (les résultats des autres concentrations d'agents inducteurs sont présentés à l'annexe 2). Dans la partie B, nous avons remarqué que la différenciation en hyphes toruleux ne se produit dans aucune des phases de croissance lorsque les cellules ont été observées 4 jours après avoir été plongées en milieu BAPS modifié (Bernèche-D'Amours , 2012). Après avoir passé 8 et 14 jours en milieu BAPS

modifié, les cellules étaient davantage différenciées en RTH lors des phases de latence, stationnaire et de déclin. Finalement, les cellules présentaient une différenciation en RTH supérieure à 20 %, sauf au jour 3, lorsqu'elles ont été laissées un peu plus longtemps en milieu BAPS modifié soit 20 jours (Tableau 4). Dans la partie C de l'expérience, les cellules semblaient plus inductibles que dans la partie B. En effet, on a remarqué qu'à tous les jours de prélèvement, sauf au jour 7, les cellules présentaient une différenciation en RTH supérieure à 20 % peu importe la durée de leur passage en milieu BAPS après leur prélèvement du bioréacteur. Au jour 7, les cellules ne se différenciaient pas en hyphes toruleux sauf lorsque ces dernières avaient passé 20 jours en milieu de culture BAPS avant d'avoir été plongées en milieu d'induction BAPS modifié (Tableau 4).

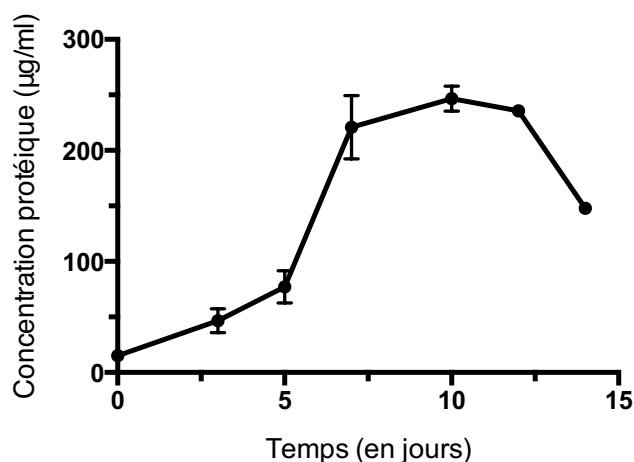


Figure 4 : Courbe de croissance de *Frankia alni* ACN14a cultivée en bioréacteur de 2,2 l. Les points noirs représentent les moments de prélèvement de cellules dans le bioréacteur pour effectuer les dosages protéiques selon la méthode de Bradford.

Tableau 4: Différenciation de *Frankia alni* ACN14a lors des différentes phases de croissance en bioréacteur de 2.2 l.

Jours de prélèvement (x)	Partie A			Partie B				Partie C			
	1) Bioréacteur 2) Microplaques			1) Bioréacteur 2) BAPS modifié				1) Bioréacteur 2) BAPS régulier 3) BAPS modifié			
	Propionate de sodium	KH ₂ PO ₄	KCl	Jour x + 4	Jour x + 8	Jour x + 14	Jour x + 20	Jour x + 4 + 14	Jour x + 8 + 14	Jour x + 14 + 14	Jour x + 20 + 14
0	++	++	++	-	+	++	++	++	++	++	++
3	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
5	+	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
10	-	+	-	-	-	++	++	+	+	+	+
12	-	-	-	-	++	++	++	++	-	++	++
14	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++

- : Différenciation faible en RTH (de 0 à 20 % des cellules vivantes sont différenciées)

+ : Différenciation moyenne en RTH (de 20 à 70 % des cellules vivantes sont différenciées)

++ : Différenciation forte en RTH (de 70 % à 100 % des cellules vivantes sont différenciées)

Partie A: résultats présentés seulement pour 50 mM de chacun des agents inducteur

Jour x : correspond aux jours de prélèvement dans le bioréacteur

Microscopie électronique à transmission

Comme observé aux Figures 5 A. et B., en milieu BAPS régulier, les hyphes de *Frankia alni* ACN14a sont peu septés comparativement aux différents milieux d'induction. Chacun de ces derniers a engendré la formation d'hyphes toruleux, c'est-à-dire des hyphes très septés (Figures 5 C. à H.).

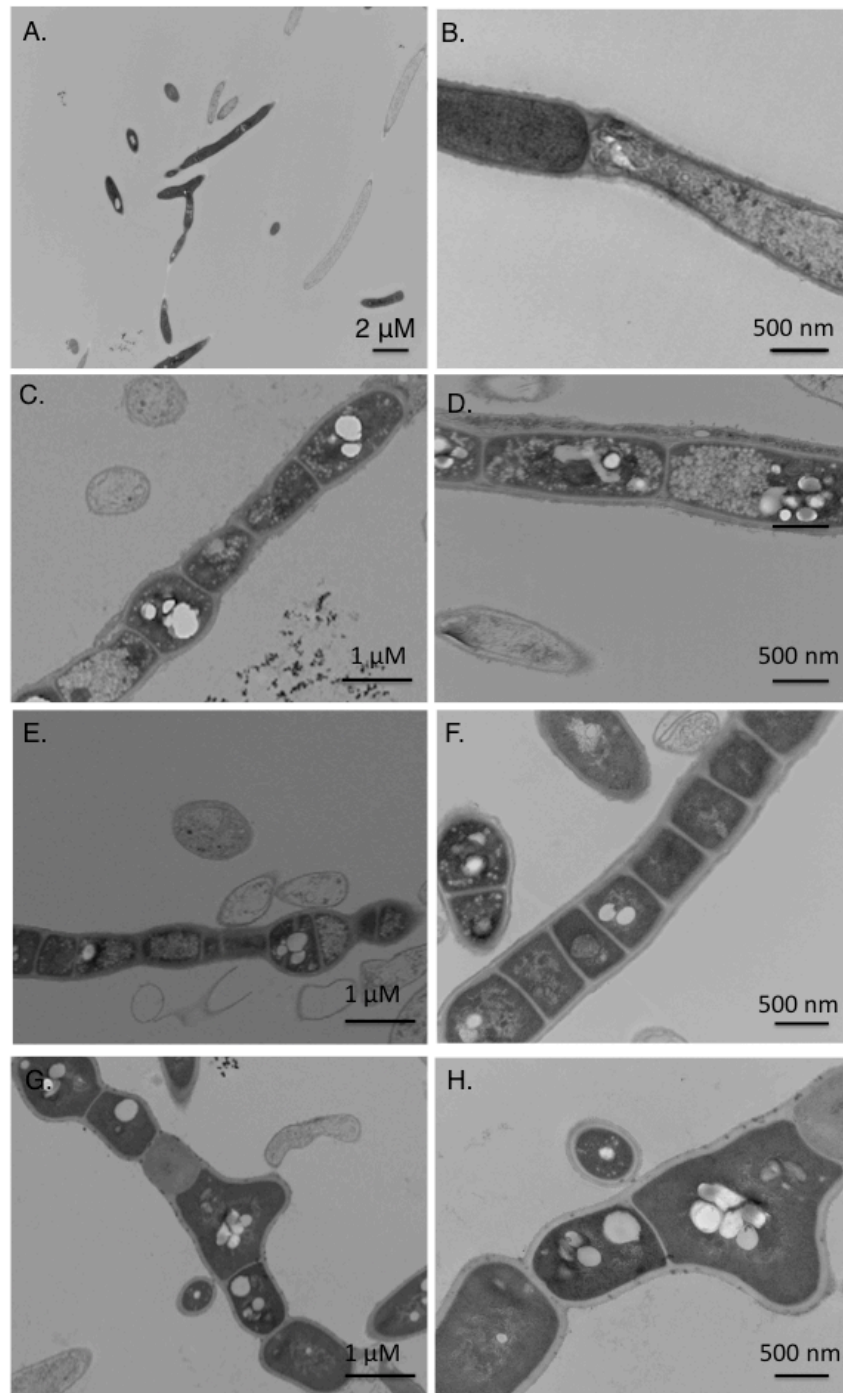


Figure 5 : Observation de 8 champs microscopiques par microscopie électronique à transmission de *Frankia alni* ACN14a différenciée en hyphes toruleux dans différents milieux d'induction. Hyphes végétatifs en milieu BAPS régulier (A. et B.), hyphes toruleux induits en milieu BAPS modifié (50 mM de KH_2PO_4 à pH 5,85) (C. et D.),

hyphes toruleux induits en milieu BAPS + 40 mM de KCl à pH 5,85 (E. et F.) et hyphes toruleux induits en milieu BAPS + 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (G. et H.). Grossissement total de 1800x (A.), de 2500x (C. E. et G.) et de 10 000x (B., D., F. et H.).

Plus spécifiquement, l'épaisseur des cellules augmentait dès qu'elles se retrouvaient dans un milieu d'induction (BAPS 50 mM de KH_2PO_4 , 50 mM de propionate de sodium et 40 mM de KCl) (Figure 6 A.). On peut remarquer que le septum est plus épais lorsque les cellules ont été cultivées dans un milieu BAPS 50 mM de propionate de sodium que lorsqu'elles ont été cultivées dans tous les autres types de milieux inducteurs (Figure 6 B.). La paroi bactérienne de *Frankia alni* ACN14a est aussi plus épaisse lorsque les microorganismes ont été cultivés dans du BAPS 50 mM de KH_2PO_4 et 40 mM de KCl (Figure 6 C.). De plus, la membrane plasmique est généralement plus épaisse lorsque les cellules ont été cultivées dans les milieux inducteurs, mais par ailleurs, elle l'est encore plus dans les milieux BAPS contenant 50 mM de KH_2PO_4 et 50 mM de propionate de sodium que celui contenant 40 mM de KCl (Figure 6 D.).

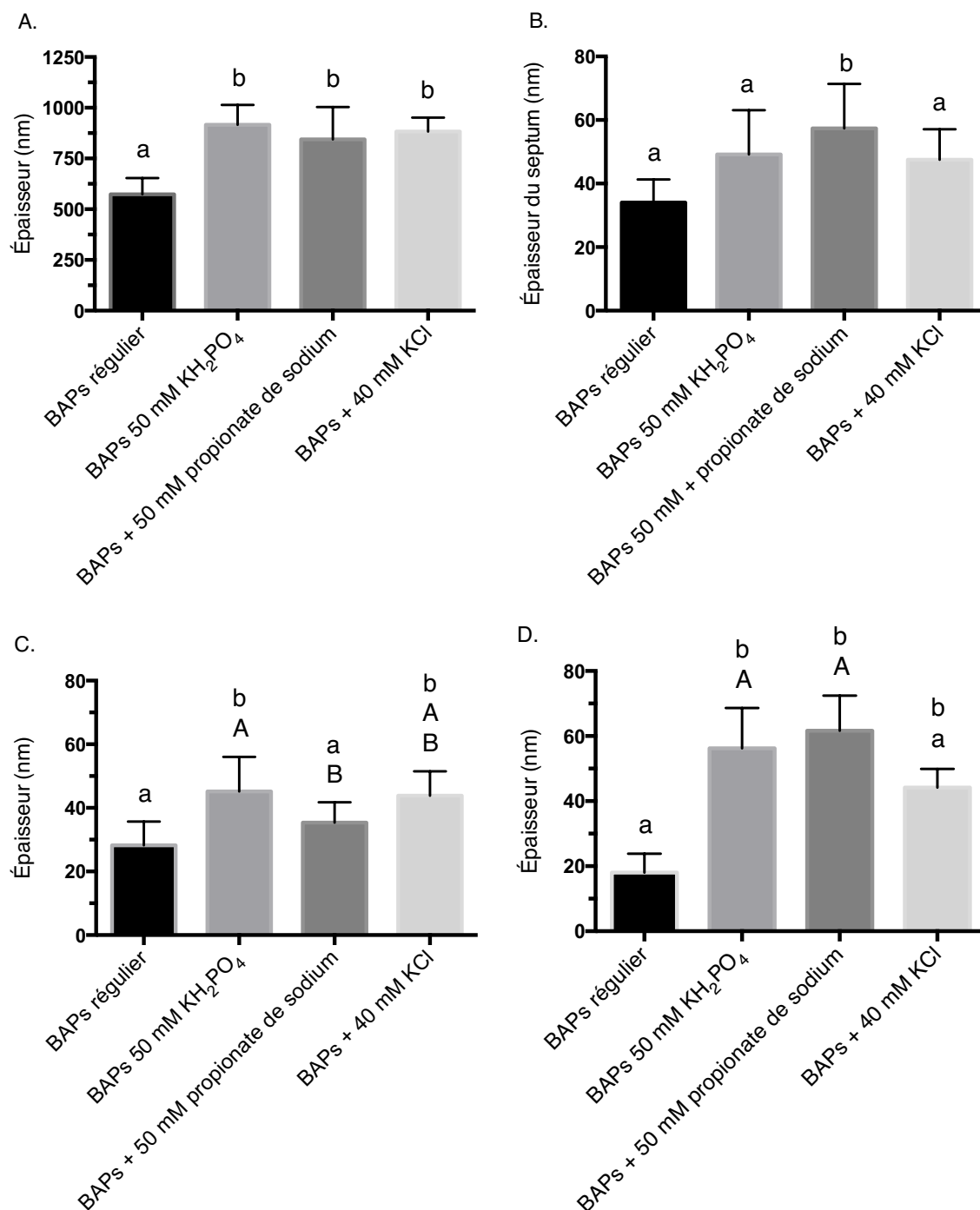


Figure 6: Paramètres de *Frankia alni* ACN14a en TEM lorsque cultivée dans divers milieux inducteurs d'hyphes toruleux. Épaisseur totale des cellules (A.), épaisseur du septum entre les cellules (B.), épaisseur de la paroi bactérienne (C.) et de la membrane plasmique (D.), (n = 4-12, les lettres différentes représentent une

différence significative, après un test d'ANOVA suivi d'un test de multicomparaison de Tukey's).

Discussion

Frankia alni ACN14a est cultivée en milieu BAPS régulier (Igual et Dawson, 1999; Bélanger *et al.*, 2011). Dans ce milieu de culture, nous observons des hyphes toruleux en faible proportion (entre 0 à 5 % de matériel différencié en RTH) (S.Roy, données non publiées). D'ailleurs, Diem et Dommergues (1985) ont répertorié ce quatrième type de morphologie chez *Frankia* sp. Cj1-82, les « *Reproductive Torulose Hyphae* » (RTH). Ces derniers ont observé ces structures dans des coupes de plantes et en milieu de culture Qmod liquide supplémenté de 0,013 % de charbon activé. Diem et Dommergues (1985) ont utilisés un pré-inoculum âgé de 3 semaines, d'un mois et de 2 mois et ils ont observé que le nombre de colonies compté après 2 semaines d'incubation sur milieu Qmod agar augmente avec l'âge du pré-inoculum. Diem et Dommergues (1985) ont expliqué ce phénomène en proposant que la production de colonies sur milieu Qmod agar s'accroît avec l'âge du pré-inoculum. Ainsi après plusieurs semaines de croissance en milieu Qmod liquide, ce seraient les RTH présent dans le pré-inoculum qui initient la reprise de croissance en hyphes végétatifs lorsque les cellules sont mises dans sur milieu Qmod agar (Diem et Dommergues, 1985). Les RTH observés par Diem et Dommergues (1985) se trouvaient en milieux stressants, soit dans des coupes de plantes ou encore dans de vieilles cultures de Qmod liquide. Le milieu BAPS modifié élaboré par Bernèche-D'Amours (2012), par sa composition élevée en KH_2PO_4 (et son pH acidifié), permet de créer un environnement assez stressant pour permettre la différenciation massive en hyphes toruleux. Afin d'étudier ces structures et de comprendre leur(s) rôle(s)

dans le cycle de vie de *Frankia*, il est primordial de bien comprendre le fonctionnement de l'induction des RTH. Une fois bien compris, il sera plus facile d'induire la différenciation en RTH à grande échelle en bioréacteur de 2,2 l pour produire ces structures en grande quantité et ainsi pouvoir les étudier.

Production de RTH à l'échelle de croissance d'ermeneyer de 125 ml

La différenciation en hyphes toruleux ne se produit pas dans toutes les phases de croissance. On peut remarquer lorsque le pré-inoculum est inoculé à 15 µg de protéines/ml que la différenciation en hyphes toruleux ne se produit que dans la phase stationnaire de croissance en milieu BAPS modifié (Figure 3). Par contre, lorsque le pré-inoculum est inoculé à 7,5 µg de protéines/ml, la différenciation en hyphes toruleux se produit dans les phases de croissance exponentielle et stationnaire en milieu BAPS modifié (Figure 3). Il a déjà été rapporté dans la littérature que l'âge d'un pré-inoculum avait un impact majeur sur la quantité de métabolites secondaires produits et sur la reproductibilité des résultats obtenus (Paquet, 1990; Paquet *et al.*, 1992; El-Enshasy *et al.*, 2000, Saffroy, 2006). En effet, Saffroy (2006) a démontré que des cellules de *Streptomyces pristinaespiralis* âgées de 28, 36, 72 et 96 heures étaient en mesure de produire de la pristinamycine alors que des cellules âgées de 46 heures n'étaient pas en mesure de le faire. El-Enshasy *et al.* (2000) ont aussi observé que le type d'inoculum utilisé (des spores versus des hyphes végétatifs) influençait la production de natamycine par *Streptomyces natalensis*. Cela rejoint les résultats que nous avons obtenus (Figure 4) qui démontrent que les cellules ne sont pas inductibles à tous les moments de leur cinétique de croissance. Par ailleurs, l'état physiologique du pré-inoculum, en plus de la concentration au départ ont des répercussions sur la différenciation en hyphes

toruleux. Comme observé à la figure 3, une concentration protéique initiale différente de 15 µg de protéines/ml versus 7,5 µg de protéines/ml, a permis la différenciation en hyphes toruleux lors de différentes phases de croissance pour le même microorganisme.

Chez *Frankia alni* ACN14a la formation d'hyphes toruleux survient lorsque les cellules se retrouvent dans un environnement très défavorable à leur croissance, dans un milieu présentant un choc osmotique important (50 mM de KH_2PO_4) et un pH acidifié (Bernèche-D'Amours, 2012). Dans ce milieu, 60 à 70 % des cellules meurent et les cellules qui demeurent en vie sont différenciées en hyphes toruleux (S.Roy, données non publiées). Bernèche-D'Amours (2012) a observé que lorsque *Frankia alni* ACN14a se trouve en milieu BAPS modifié il n'y a aucune production de biomasse, ainsi les cellules semblent constamment en phase stationnaire de croissance. Par ailleurs, la production de métabolites secondaires chez *Streptomyces* sp. est finement associée avec son milieu environnant. En effet, lorsque les microorganismes se trouvent dans un milieu où les concentrations de carbone, de phosphate et d'azote se trouvent en concentration suffisante, il n'y aura pas ou très peu de production de métabolites secondaires (Demain, 1983; Saffroy, 2006; Rodríguez *et al.*, 2013). L'absence de l'un ou l'autre de ces éléments est associé avec un arrêt de la croissance (phase stationnaire de croissance) en plus d'une production de métabolites secondaires (Demain, 1983). Comme chez *Streptomyces* sp., la production d'hyphes toruleux semble également liée avec un changement dans le milieu de culture, mais aussi par l'état physiologique du pré-inoculum et par la densité d'inoculation.

Il a été démontré dans la littérature que le quorum sensing avait un impact sur une multitude de fonctions cellulaires, entre autres, la production d'enzymes extracellulaires, la production de biofilm, l'apparition de facteurs de virulence ainsi que le type de morphologie (Schauder *et al.*, 2001 ; Loh *et al.*, 2002 ; Hogan *et al.*, 2004). Une étude réalisée par Lawton *et al.* (1990), a montré que la concentration de spores d'un inoculum de diverses souches de *Streptomyces* sp. avait un impact majeur sur la morphologie des cellules. En effet, une faible concentration de spores dans l'inoculum de départ entraînait une morphologie de *pellets* compacts. À l'opposé, une grande quantité de spores dans l'inoculum de départ entraînait un morphotype de mycélium agrégé (Lawton *et al.*, 1990). Comme les résultats présentés par Lawton *et al.* (1990), la concentration du pré-inoculum chez *Frankia alni* ACN14a a un impact majeur sur la différenciation en hyphes toruleux, puisque tout dépendamment de la concentration protéique utilisée au départ, la différenciation en RTH ne se produit pas dans les mêmes phases de croissance (Figure 3).

Échelle de croissance en bioréacteur de 2,2 l

La croissance de cellules en bioréacteur permet d'obtenir de très grande densité cellulaire en peu de temps. Nous désirons induire la production de RTH en bioréacteur, mais comme décrit précédemment, la phase de croissance ainsi que l'état physiologique de la culture influence la différenciation cellulaire chez *Frankia alni* ACN14a. Ainsi, la compréhension de la dynamique d'induction des RTH et l'influence de différentes molécules sont primordiales avant de passer à l'induction des RTH à l'échelle de croissance de bioréacteur de 2,2 l. Donc, dans un premier temps, des échantillons ont été prélevés du bioréacteur lors de chacune des phases de croissance et ont étéensemencés directement dans des microplaques contenant

diverses concentrations de 3 agents inducteurs de la différenciation en hyphes toruleux (Bernèche-D'Amours, 2012; Lafond-Lambert, 2014).

Lorsqu'on inocule directement des microplaques avec des cellules provenant d'un bioréacteur, on peut observer que la différenciation en hyphes toruleux n'a pas eu lieu peu importe la phase de croissance testée (Tableau 4, partie A). Les microorganismes se trouvant dans un bioréacteur ont un métabolisme beaucoup plus actif que celui retrouvé chez les organismes cultivés en microplaques, car les conditions de croissance dans un bioréacteur sont optimales (Präve, 1987). Ainsi, le fait de passer de conditions optimales pour la croissance (en bioréacteur) à des conditions beaucoup moins optimales pour la croissance (en microplaques) semble causer un stress beaucoup trop important pour les microorganismes. Ceci se traduit par un pourcentage de viabilité faible et une absence de différenciation en hyphes toruleux. La viabilité des microorganismes est sensible à de nombreux facteurs dont l'échelle de croissance. Ainsi lorsque les microorganismes passent d'un bioréacteur à des microplaques (changement de l'échelle de croissance), cela pourrait expliquer l'absence de différenciation en RTH (Schweikart et Frank, 1997). L'agitation et l'aération ne se produisent pas de la même façon en microplaques qu'en bioréacteur ce qui entraîne un choc pour les microorganismes. Par exemple, *Azotobacter vinelandii*, est une bactérie aérobique obligatoire en plus d'être capable de fixer l'azote grâce à l'enzyme nitrogénase. Ainsi l'excès d'oxygène dans son milieu entraîne un arrêt de la fixation d'azote en plus d'une augmentation rapide de la respiration cellulaire (Haddock et Jones, 1977). Ces événements sont couplés à la mobilisation de matériaux de stockage, comme les polysaccharides et le poly- β -hydroxybutyrate. De plus Haddock et Jones (1977) ont observés une synthèse plus importante de cytochrome *d*, de NADH et NADPH deshydrogénases. Lors de ces conditions, une perte d'énergie et une diminution de l'efficacité globale de la chaîne respiratoire sont

observées chez les cellules (Haddock et Jones, 1977). Ceci implique que les microorganismes doivent posséder des mécanismes permettant d'offrir suffisamment d'oxygène pour permettre la respiration, mais en quantité où elle n'inhibera pas la fixation de l'azote. Comme chez *Azotobacter vinelandii*, *Frankia alni* ACN14a pourrait posséder des mécanismes pour lutter contre l'excès ou les changements d'oxygène dans son environnement. Ceci pourrait se traduire par une absence de différenciation en RTH en bioréacteur de 2,2 l.

Dans la partie B, lorsque les microorganismes ont été prélevés du bioréacteur puis inoculés en milieu BAPS modifié, nous avons voulu déterminer à quel(s) moment(s) de la croissance en bioréacteur de 2,2 l *Frankia alni* ACN14a était inductible en hyphes toruleux (Bernèche-D'Amours, 2012). Nous avons observé que lorsque les microorganismes se trouvaient en phase de croissance exponentielle (Figure 4, jour 3 à jour 7), la différenciation en hyphes toruleux était beaucoup plus difficile. En effet, on peut observer que les prélèvements effectués au jour 3 ne sont pas inductibles même lorsqu'ils sont plongés durant 20 jours en milieu BAPS modifié pour l'induction (Tableau 4, partie B). Par contre, aux jours 5 et 7 les cellules sont faiblement inductibles, mais seulement après 20 jours en milieu BAPS modifié (Tableau 4, partie B). En phase exponentielle de croissance, les microorganismes ont un régime métabolique très rapide et ces derniers ont enclenché les voies métaboliques nécessaires à la croissance, ceci fait en sorte qu'il est probablement très difficile pour ces derniers de mettre en marche les mécanismes nécessaires pour pouvoir se différencier en hyphes toruleux (Scriban, 1999). En effet, la cinétique de croissance bactérienne est intimement liée à la production de métabolites primaires tels que des acides aminés et des vitamines nécessaires pour la production de biomasse (Scriban, 1999). Les mécanismes de production de métabolites primaires sont soumis à des régulations très strictes qui empêchent le gaspillage, ceci fait en sorte que lorsque

ces mécanismes sont activés, il est très difficile de les arrêter, ce qui pourrait expliquer l'absence de différenciation en hyphes toruleux lorsque les microorganismes se trouvent dans la phase de croissance exponentielle (Scriban, 1999). De plus, selon Diem et Dommergues (1985) et Bernèche D'Amours (2012), la différenciation en RTH semble être un phénomène associé aux stress. En effet, ils ont observés une différenciation en RTH lorsque les microorganismes étaient cultivés très longtemps ou encore lorsqu'ils étaient soumis à un stress osmotique combiné à une diminution de pH (Diem et Dommergues, 1985; Bernèche D'Amours 2012). Ainsi, en phase de croissance exponentielle, les microorganismes ne sont aucunement en présence d'éléments stressants ce qui se traduit par une absence de différenciation. Lorsque les cellules sont en phase stationnaire et de déclin, ces dernières ont un régime métabolique beaucoup plus lent et ainsi sont beaucoup plus enclines à enclencher les mécanismes impliqués dans la différenciation en hyphes toruleux ce qui se traduit par une différenciation massive en RTH aux jours 10, 12 et 14 (Tableau 4, partie B). Par la suite, nous avons voulu déterminer si le fait de changer d'échelle de croissance, soit du bioréacteur à l'erlenmeyer de BAPS régulier, allait faciliter la différenciation en hyphes toruleux, lorsque les cellules étaient ensuite plongées en milieu BAPS modifié. Le milieu BAPS régulier semble faire le pont entre le bioréacteur et le BAPS modifié en permettant aux microorganismes de passer d'un régime métabolique optimal en bioréacteur, à un régime métabolique moins optimal, en erlenmeyer de BAPS, et ensuite passer à un régime métabolique sous-optimal en milieu stressant et inducteur, le milieu BAPS modifié. Cette formule semble plus efficace que celle de la partie B (directement d'un bioréacteur à milieu BAPS modifié) puisqu'à tous les jours de croissance mis à part au jour 7, (Tableau 4, partie C) on observe une différenciation en RTH. Au jour 7, les microorganismes sont en fin de croissance exponentielle (Figure 4) et ne présentent pas le même régime métabolique que les bactéries aux autres jours de croissance ce qui pourrait expliquer

l'inefficacité de la différenciation en hyphes toruleux, même si les cellules passent par un milieu BAPS régulier avant d'être plongées en milieu BAPS modifié.

Microscopie électronique à transmission

Les hyphes végétatifs cultivés dans le milieu BAPS sont plus minces que les hyphes toruleux cultivés dans les divers milieux d'induction (BAPS 50 mM de KH_2PO_4 , 50 mM de propionate de sodium et 40 mM de KCl). De plus, les hyphes cultivés dans les milieux BAPS 50 mM de KH_2PO_4 et BAPS + 40 mM de KCl présentent une paroi bactérienne plus épaisse que celle des cellules cultivées en milieu BAPS. Par ailleurs, les membranes plasmiques des cellules sont plus épaisses dans toutes les conditions inductrices testées. Ces résultats concordent avec ceux de Diem et Dommergues (1985) et Bernèche-D'Amours (2012) qui stipulaient que la paroi bactérienne ainsi que la membrane plasmique étaient plus épaisses chez les hyphes toruleux que celle des hyphes végétatifs. Il a déjà été démontré dans la littérature qu'un choc osmotique occasionne un changement dans la composition des lipides de la membrane cellulaire, qui peut se traduire par un épaississement de cette dernière (Beales, 2003). En effet, il semblerait que les lipides anioniques tel que le diphosphatidylinositol et le phosphatidylglycérol deviennent plus abondants lors de chocs osmotiques (Russel, 1989; Beales, 2003).

De plus, lorsque les bactéries font face à un choc osmotique, elles arrêtent leur croissance et accumulent dans leur cytoplasme des molécules protectrices (aussi connues sous le nom de solutés compatibles) tels que la glycine béatïne (N,N,N-triméthylglycine) (Galinski et Truper, 1994; Romeo *et al.* 2001). Ces molécules

protectrices sont représentées par des vacuoles dans le cytoplasme comme il est observé dans le cytoplasme des cellules de *Frankia alni* ACN14a exposées à des conditions inductrices (Figures 5 C. à H.)

Conclusion

Dans cette revue de littérature nous avons étudié les mécanismes qui permettent l'induction du morphotype toruleux chez l'actinobactérie *Frankia alni* ACN14a. Dans la littérature, le morphotype toruleux avait été observé chez les souches de *Frankia* sp. Cj1-82, CeF1-82, CeD1-82, FCc64, FCe33 et FMr43. Nous avons observé que le morphotype toruleux n'était pas induit à n'importe quel moment de la croissance autant en erlenmeyer de 125 ml qu'en bioréacteur de 2,2 l. L'induction du morphotype toruleux ne se produit pas lors de la phase de croissance exponentielle des cellules. Ainsi, l'état physiologique des cellules a un impact majeur à jouer dans la différenciation en RTH. Ces résultats suggèrent que la différenciation en hyphes toruleux pourrait être possible chez d'autres souches de *Frankia* spp. comme *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 pourvu que les cellules soient dans un état physiologique approprié.

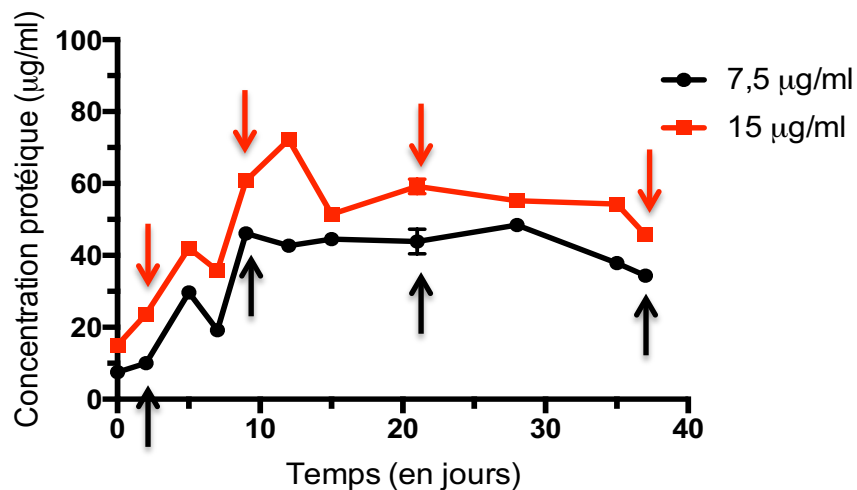
Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Anne Vézina et Charles Bertrand pour la préparation des échantillons pour la TEM ainsi que pour leur assistance technique. De plus, nous tenons à remercier le Fond de Recherche québécois Nature et Technologie (FRQNT)

et le Conseil de Recherche en Sciences naturelles et Génie (CRSNG) pour leurs appuis financiers.

ANNEXES

Annexe 1: Courbes de croissance de *Frankia alni* ACN 14a provenant d'erlenmeyers inoculés à 7,5 et 15 μg de protéines/ml.



Courbes de croissance *Frankia alni* ACN 14a provenant d'erlenmeyers inoculés à 7,5 et 15 μg de protéines/ml. Les flèches noires et rouges représentent les moments choisis comme étant ceux correspondants à la phase de latence, de croissance exponentielle, stationnaire et de déclin respectivement.

Annexe 2 : Résultats concernant des concentrations d'agents inducteurs additionnelles à celles présentées dans le corpus de l'article

Prélèvement fait au jour 0								
Microscopie			Microscopie			Microscopie		
Concentration de propionate de sodium (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KH_2PO_4 (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KCl (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)
5	70	0-5	5	80	10	0	80	0-5
40	90	30	40	40	90	40	50	50
50	90	50	50	40	90	50	50	50
60	60	10-15	60	20	90	60	40	70
Prélèvement fait au jour 3								
5	90	0-5	5	80	0	0	90	5
40	80	10	40	30	0	40	30	0
50	70	0-5	50	50	0-5	50	50	0-5
60	80	5	60	30	0	60	30	0

Prélèvement fait au jour 5								
Microscopie			Microscopie			Microscopie		
Concentration de propionate de sodium (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KH_2PO_4 (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KCl (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)
5	60	0-5	5	50	5	0	50	0
40	80	0-5	40	30	0	40	60	5
50	70	30	50	60	0-5	50	60	5
60	70	0-5	60	40	5	60	40	10
Prélèvement fait au jour 7								
5	70	5	5	60	0-5	0	50	0
40	80	5	40	80	0-5	40	80	0-5
50	80	5	50	70	0-5	50	70	0-5
60	80	5	60	80	0-5	60	80	0-5

Prélèvement fait au jour 10								
Microscopie			Microscopie			Microscopie		
Concentration de propionate de sodium (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KH_2PO_4 (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KCl (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)
5	50	0-5	5	50	0-5	0	60	5-10
40	80	0-5	40	80	10	40	50	5
50	80	5	50	80	20	50	40	5
60	70	0	60	80	5	60	40	5
Prélèvement fait au jour 12								
5	50	10	5	80	5	0	60	10
40	80	5	40	90	5	40	90	5
50	80	5	50	60	5	50	60	5
60	50	5-10	60	50	5	60	50	5

Prélèvement fait au jour 14								
Microscopie			Microscopie			Microscopie		
Concentration de propionate de sodium (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KH_2PO_4 (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)	Concentration de KCl (mM)	Matériel vivant (%)	Matériel différencié en RTH (%)
5	80	5	5	80	0	0	70	50
40	70	10	40	70	5	40	80	10
50	80	10	50	50	10	50	70	10
60	80	10	60	30	10	60	80	10

Références

Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W., and Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* 5 (2), 109-114.

Bassi, C.A., and Benson, D.R. (2007). Growth characteristics of the slow-growing actinobacterium *Frankia* sp. strain Ccl3 on solid media. *Physiol. Plantarum* 130, 391-399.

Beales, N.J. (2003). Adaptation of microorganisms to cold-temperature, weak acids preservatives, low-pH, and osmotic stress: A Review. *Int. of food technologists* 3, 1-20.

Bélanger, P.-A., Beaudin, J., and Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *J. Microbiol. Methods* 85, 92-97.

Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57, 293-319.

Bernèche-D'Amours, A. (2012). Étude de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia alni* ACN14a. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.

Berry, A.M., Harriott, O.T., Moreau, R.A., Osman, S.F., Benson, D.R., and Jones, A.D. (1993). Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6091-6094.

Chaia, E.E., Wall, L.G., and Huss-Danell, K. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review. *Symbiosis* 51, 201-226.

Clark, G.J., and Bushell, M.E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker et bioreactor culture. *Microbiol.* 141, 663.

Demain, A.L., Aharanowitz Y., and Martin, J.F. (1983). Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. *Biochemistry et genetic regulation of commercially important antibiotics.* (Addison-Wesley : London) pp 49-67.

Diem, H.G., and Dommergues, Y. (1985). *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil* 87,17-29.

El-Enshasy, H.A., Farid, M.A. and El-Sayed, S.A. (2000). Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40(5-6), 333-342.

Galinski, E-A., and Truper, H.G. (1994). Microbiol behavior in salt-stressed ecosystems, *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 95–108.

Hilgendorf, P., Heiser, V., Diekmann, H., and Thomas, M. (1987). Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: Applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 247-251.

Hogan, D., Vik, A., and Kolter, R. (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiol.* 54(5), 1212-1223.

Igual, J., and Dawson, J. (1999). Stimulatory effects of aluminum on *in vitro* growth of *Frankia*. *Can. J. of Bot.* 77, 1321-1326.

Krumholz, G.D., Chval, M.S., McBride, M.J., and Tisa, L.S. (2003). Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant Soil* 254, 57-67.

Lafond-Lambert, C. (2014). La morphogénèse d'hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia* spp. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.

Lawton, P., Withaker, A., and Odell, D. (1989). Actinomycetes morphology in shaken culture. *Can. J. Microbiol.* 35, 881-889.

Loh, J., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Stacey, G. and Chatterjee, A. (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 285–29

Normand, P., and Lalonde, M. (1982). Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Can. J. Microbiol.* 28, 1133-1142.

Paquet, V. (1990). Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

Paquet, V., Goma, G., and Soucaille, P. (1992). Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. lett.* **14** (11), 1065-1070.

Persson, T., Benson, D. R., Normet, P., Heuvel, B. V., Pujic, P., Chertkov, O., Teshima, H., Bruce, D.C., Detter, C., Tapia, R. *and al.* (2011). Genome sequence of " *cetidatus Frankia datiscae* " Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. *J. Bacteriol.* **193**: 7017-7018.

Präve, P., Faust, W., Sitting, W., and Sukatsch, D.A. (1987). Basic biotechnology: a student's guide. (New York: VCH). pp 60-70.

Tresmerh, D., Hayes, A., et Backuse, J. (1967). Morphology of submerged growth of *streptomycetes* as a taxonomic aid, Morphological development of *Streptomyces aureofaciens* in agitated liquid media. *Appl. Microbiol.* **15**, 1185-1191.

Saffroy, S. (2006). Étude du métabolisme carboné chez *streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine.

Schweikart, J., and Frank, O. (1997). Fermentation and biochemical engineering hetbook: principles, process design, and equipment. *Chemical Eng.* **104**, 14.

Schauder, S., and Bassler, B.L. (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev.* **15**, 1468–1480

Scriban, R. (1999). Biotechnologie. (Paris: Lavoisier TEC DOC)

Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Ramón, S. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial Cell Factories* **12**, 127.

Romeo, Y., Bouvier, J. et Guitierrez, C. (2001). La réponse aux stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). *INRA, EDP Sciences* **81**, 49-54.

Russell, N.J. (1989). Functions of lipids: structural roles and membrane functions. *Microbial lipids* (London: Academic Press). pp 279–365.

Vardar, F. (1983). Problems of mass et momentum transfer in large fermentors. *Process. Biochem.* **18**, 21-23.

Vardar, F. and Lilly, M.D. (1982). Effect of cycling dissolved oxygen concentrations on product formation in penicillin fermentations. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 302-311.

Xie, Y. (2009). Biological characteristics of *Frankia* isolated from different actinorhizal plants. *Chin. J. App. Environ. Biol.* **15**, 645-649.

CHAPITRE 3 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN MICROPLAQUES POUR PRODUIRE ET ÉTUDIER LES HYPHES TORULEUX

3.1 Mise en contexte

La croissance de *Frankia alni* ACN14a en bioréacteur implique une consommation importante de propionate de sodium, sa source préférentielle de carbone (S.Roy, données non-publiées). Des ajouts de propionate de sodium ont été faits dans le but d'optimiser la croissance du microorganisme. Dans la mesure où ces ajouts entraînaient des fluctuations de carbone dans la cuve et, par le fait même, pouvaient potentiellement avoir une incidence directe sur les essais d'induction de la différenciation en hyphes toruleux, nous avons voulu déterminer quelle(s) concentration(s) maximale(s) de propionate de sodium pouvait (ent) être utilisée(s) au départ sans affecter la croissance des cellules. Ainsi, la détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium en microplaques a été faite. En plus de déterminer le seuil bactériostatique du propionate de sodium, nous avons observé une différenciation massive en hyphes toruleux en présence de 50 mM de propionate de sodium. En tenant compte de cette observation, diverses conditions en microplaques ont été étudiées dans ce chapitre afin d'optimiser la différenciation cellulaire en RTH. De ce fait, plusieurs combinaisons d'agents inducteurs ont été essayées (propionate de sodium combiné avec du KH_2PO_4 , du KCl, de l'acide citrique). De plus, diverses concentrations de biomasse ont aussi mises en présence de 50 mM de propionate de sodium et finalement l'effet du stress (en présence de 50 mM de propionate de sodium) dans le temps a été évalué à 2, 4 et 8 semaines. Ces expériences nous ont permis de mieux cerner la ou les combinaisons d'agents inducteurs qui pouvaient induire la différenciation en hyphes toruleux et, de cette

façon les utiliser en bioréacteur pour induire la différenciation à grande échelle. Par le fait même, il nous semblait intéressant d'essayer diverses combinaisons d'agents inducteurs à des pH de 5,85 et 6,70. Le pH acide pourrait être la potentielle cause de la mortalité aussi importante en milieu d'induction des RTH et il pourrait être intéressant de trouver une combinaison d'agents inducteurs qui permettrait la différenciation en hyphes toruleux à pH 6,70 (Bernèche-D'Amours, 2012; Faure-Raynaud *et al.*, 1986).

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Souches bactériennes utilisées et conditions de croissances

Trois souches bactériennes ont été utilisées pour les expériences réalisées dans ce chapitre, soit *Frankia alni* ACN14a (ULQ0102014010), *Frankia* sp. ACN10a (ULQ010201001) et *Frankia* sp. Avcl1 (DDB01020110). Ces souches proviennent de la collection du Pr. Maurice Lalonde du Centre d'étude de la forêt de l'Université Laval (Normand et Lalonde, 1982). Les codes alphanumériques rattachés à chacune des souches sont une numérotation arbitraire établie par Normand et Lalonde(1982). Les conditions de croissance étudiées, la préparation des inocula, le dosage protéique et la microscopie à épifluorescence ont été effectués tel que décrits dans la section matériel et méthodes du chapitre 1.

3.2.2 Milieux de culture inducteurs étudiés

Chacune des solutions inductrices utilisées dans ce chapitre est présentée dans le tableau 1. Par ailleurs, il est important de noter que ces solutions ont été ajoutées au milieu BAPS afin de créer un environnement inducteur.

Tableau 1: Présentation des solutions inductrices

Solutions inductrices	Concentrations finales étudiées (mM)
Propionate de sodium (détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium)	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 et 60
Propionate de sodium (détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium)	5, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 et 45
KH_2PO_4	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
Mélange de propionate de sodium et KH_2PO_4	Propionate: 50 (fixe) KH_2PO_4 : 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
KCl	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
Mélange de propionate de sodium et KCl	Propionate: 50 (fixe) KCl: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100

Acide citrique	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
Mélange de propionate de sodium et acide citrique	Propionate: 50 (fixe) Acide citrique: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100
Sodium succinate hexahydrate	0; 3,7; 7,4; 11,0; 14,8; 18,5; 19; 22,2; 25,9; 29,6; 33,3; 37; 40,7; 56; 74; 93; 111; 130; 148; 167; 185; 204 et 222

3.2.3 Évaluation de la respiration cellulaire des cultures par l'addition du réactif MTS/PMS

Tout d'abord, 15 µl du réactif MTS/PMS ont été ajoutés dans chacun des puits des microplaques devant être évalués. Par la suite, les plaques ont été incubées durant 4 h, à 30 °C, à l'obscurité et de façon statique (Bélanger *et al.*, 2011). L'évaluation de la respiration cellulaire totale a été possible en effectuant une lecture des surnageants de culture à 490 nm grâce au lecteur de microplaque Biochrom Asys model UV340 (Biochrom, Cambridge, UK). Les résultats de respiration cellulaire ont été analysés et les graphiques générés par le logiciel Graph Pad Prism 6 pour Mac OS X (Version 6.0d, GraphPad Software Inc, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

3.2.4 Méthode de criblage en microplaques 96 puits

3.2.4.1 Détermination du seuil de propionate de sodium et combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différents agents inducteurs physiques ou chimiques sur la différenciation en RTH

Plusieurs séries de microplaques ont été réalisées telles que décrites dans Bélanger *et al.* (2011). Pour ce faire, 100 µl de BAPS 2x à pH 6,70 ou pH 5,85 ont été mis dans chacun des puits de la microplaque. Par contre, l'agent inducteur devant être testé (propionate de sodium et/ou KH_2PO_4 et/ou KCl et/ou acide citrique ou sodium succinate hexahydrate) n'est pas dans le milieu BAPS, mais il est plutôt ajouté par la suite en déposant 50 µl de solutions inductrices dans les puits correspondants (Tableau 2). Ensuite, 50 µl d'inoculum concentré à 60 µg de protéines/ml ont été mis dans chacun des puits, excepté dans la colonne de puits réservée au blanc où 50 µl de saline ont été mis à la place de l'inoculum. La concentration finale de *Frankia* sp. dans les puits est de 15 µg de protéines/ml. Chacune des microplaques a été incubée 2 semaines, à la température pièce, de façon statique et à l'abri de la lumière dans un contenant de plastique contenant un béccher d'eau distillée pour prévenir l'évaporation.

Pour les expériences de combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec du KH_2PO_4 ou KCl ou acide citrique, une microplaque contrôle a été faite comme décrit ci-dessus, mais le 50 mM de propionate était omis afin de déterminer l'impact des agents inducteurs seuls. Par ailleurs, le contrôle utilisé pour les microplaques de

détermination de l'effet du temps (2, 4 et 8 semaines) et de 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en RTH, était la microplaque incubée 2 semaines.

3.2.4.2 Effet de la biomasse combiné à 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en RTH

Ces microplaques sont faites exactement comme décrit à la section 2.2.4.1. Par contre, 100 µl de BAPS 2x, sauf pour le propionate de sodium qui avait une concentration finale de 50 mM, étaient mis dans chacun des puits. Ensuite 50 µl d'eau distillée étaient ajoutés dans chacun des puits. Finalement chacune des différentes concentrations de biomasse concentrée 4 fois a été ajoutée dans les puits correspondants pour une concentration finale de biomasse de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 et 60 µg de protéines/ml. Chacune des microplaques a été incubée 2 semaines à la température pièce de façon statique et à l'abri de la lumière dans un contenant de plastique contenant un bécher d'eau distillée pour prévenir l'évaporation. Un contrôle positif de différenciation en RTH, où 15 µg de protéines/ml ont été mis en présence de 50 mM de propionate de sodium, a été fait.

Tableau 2: Présentation des conditions expérimentales de chaque série de microplaques

Expériences	Conditions inductrices (mM)	Concentration(s) protéique(s) (µg de protéines/ml)	Temps de l'incubation (semaines)	Souche(s) utilisée(s)
Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium	Propionate de sodium: 5 à 60	15	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a, <i>Frankia</i> sp. ACN10a et Avcl1
Détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium	Propionate de sodium: 5 a 60	15	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a
Effet du temps	Propionate de sodium: 50	15	2, 4 et 8	<i>Frankia alni</i> ACN14a
Effet de la biomasse	Propionate de sodium: 50	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,40, 45, 50, 55, 60	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a
Effet de la combinaison du propionate de sodium et du KH ₂ PO ₄	Propionate de sodium: 50 KH ₂ PO ₄ : 0 à 100	15	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a

Effet de la combinaison du propionate de sodium et du KCl	Propionate de sodium: 50 KCl: 0 à 100	15	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a
Effet de la combinaison du propionate de sodium à de l'acide citrique	Propionate de sodium: 50 Acide citrique: 0 à 100	15	2	<i>Frankia alni</i> ACN14a
Sodium succinate hexahydrate	Sodium succinate hexahydrate: 0 à 370	15	2	<i>Frankia</i> sp. ACN10a

3.3 Résultats

3.3.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium et effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différents agents inducteurs sur la différenciation en RTH

3.3.1.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium

La détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez la souche *Frankia alni* ACN14a nous permettait d'optimiser la concentration que nous allions utiliser en bioréacteur. On peut observer à la figure 1 A. qu'une augmentation de la respiration cellulaire de 100 % à 150 % se produit lors de l'ajout de 10 mM à 30 mM de propionate de sodium comparativement à 5 mM, qui est la concentration utilisée dans le milieu BAPS régulier. De plus, la concentration protéique augmente d'environ 30 à 50 µg de protéines/ml (Figure 1 B.). Le pH augmente légèrement à 7,5 entre 10 et 30 mM de propionate de sodium, puis il redescend graduellement à 6,70 à mesure que l'on augmente la concentration de propionate de sodium (Figure 1 A.). Le seuil bactériostatique chez *Frankia alni* ACN14a a été établi à 35 mM de propionate de sodium (Figure 3 A.).

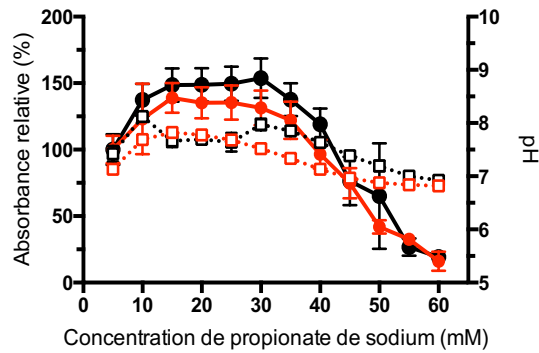
Chez *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1, l'absorbance relative, le pH ainsi que la concentration protéique ont chuté dès que la concentration de propionate de sodium dépassait 5 mM (Figure 1 C., D., E. et F.). Aucune différenciation en hyphes

toruleux n'a été observée chez *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 (Figure 2 B. et C.). Une détermination plus précise du seuil bactériostatique pour la souche *Frankia alni* ACN14a sera effectuée à la section 3.3.1.2.

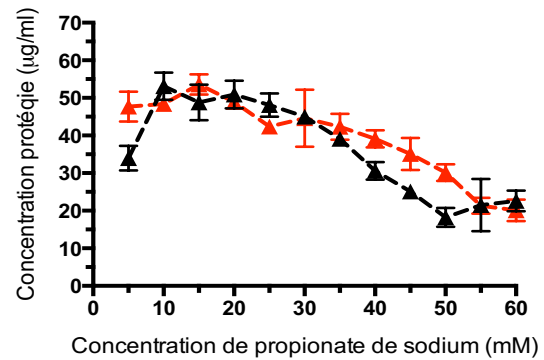
En microscopie à épifluorescence, on observe une différenciation massive en hyphes toruleux de la souche de *Frankia alni* ACN14a à partir de 50 mM de propionate de sodium. Les cellules étaient davantage vivantes qu'avec le BAPS modifié élaboré par Bernèche-D'Amours (2012). En effet, on observe un pourcentage de viabilité allant jusqu'à 70-80 % des cellules avec une différenciation en RTH de 80 à 90 % (Figure 2 A.). De plus, il est important de noter que la différenciation se produisait à des pH avoisinant 7 (Figure 1 A.), ce qui n'avait jamais été observé dans les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) et de Lafond-Lambert (2014).

En résumé, chez la souche *Frankia alni* ACN14a, la concentration de 30 mM de propionate de sodium est optimale pour la croissance (Figure 1 B.), tandis que la concentration de 50 mM de propionate de sodium est optimale pour la différenciation en hyphes toruleux (Figure 2 A.). Par contre, pour les souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 la concentration de 5 mM de propionate de sodium est optimale pour la croissance (Figure 1 D. et F.), tandis que les diverses concentrations de propionate de sodium testées sont sans effet sur la différenciation en hyphes toruleux (figure 2 B. et C.).

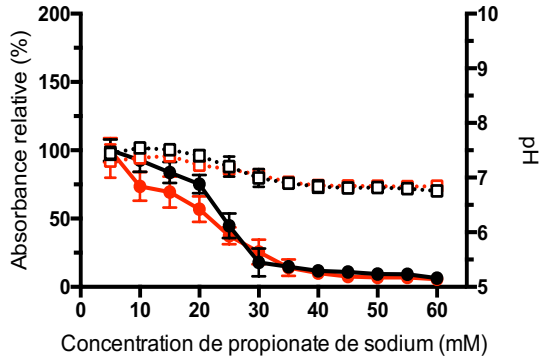
A. *Frankia alni* ACN14a



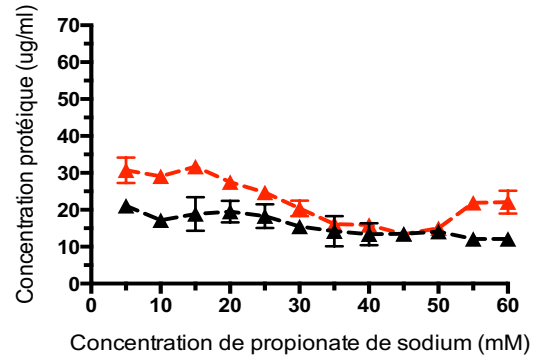
B. *Frankia alni* ACN14a



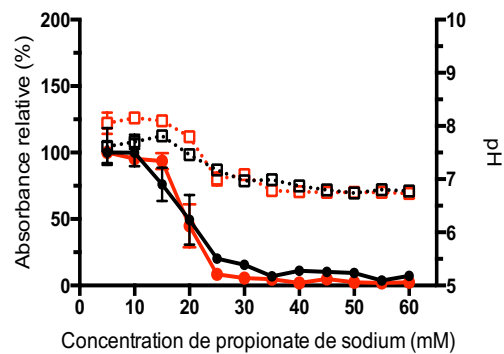
C. *Frankia* sp. ACN10a



D. *Frankia* sp. ACN10a



E. *Frankia* sp. Avcl1



F. *Frankia* sp. Avcl1

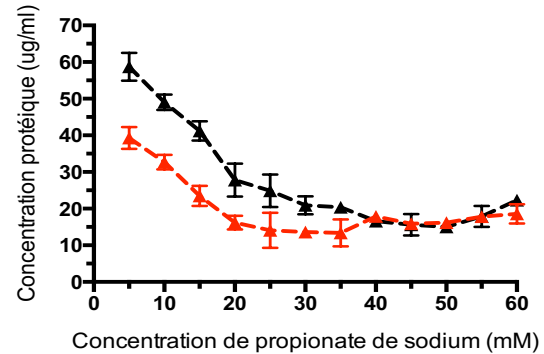


Figure 1: Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez *Frankia alni* ACN 14a (A. et B.), *Frankia* sp. ACN10a (C. et D.) et *Frankia* sp. Avcl1 (E. et F.) en présence de diverses concentrations de propionate de sodium.

L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS, l'essai 1 est représenté par (●), l'essai 2 représenté par (●) (A., C. et E.). La prise des pH de l'essai 1 est représentée par (□) et ceux de l'essai 2 par (□) (A., C. et E.). La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford et elle a été révélée à 595 nm, l'essai 1 est représenté par (▲) et l'essai 2 est représenté par (▲) (B., D. et F.).

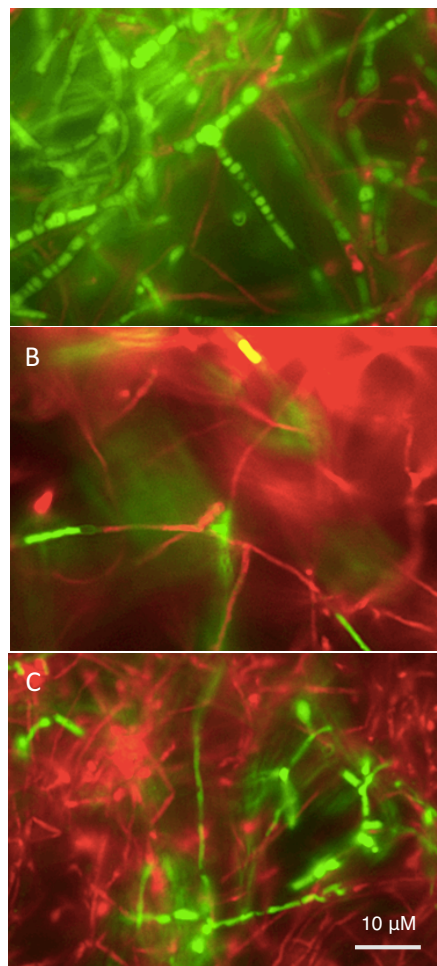


Figure 2: Essais de différenciation en hyphes toruleux en présence de 50 mM de propionate de sodium. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules colorées avec le

colorant *LIVE/DEAD®*, après 2 semaines d'incubation à la température pièce chez *Frankia alni* ACN14a (A.), *Frankia* sp. ACN10a (B.) et *Frankia* sp. Avcl1 (C.) en présence de 50 mM de propionate de sodium.

3.3.1.2 Détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez la souche *Frankia alni* ACN14a

La détermination plus précise du seuil bactériostatique a été effectuée pour la souche *Frankia alni* ACN14a seulement puisque c'est avec cette souche que les essais en bioréacteurs ont été effectués. L'absorbance relative avoisine 150 % jusqu'à la concentration de 39 mM de propionate de sodium où elle commence à chuter (Figure 3 A.). La prise du pH ainsi que la concentration protéique montre un patron constant aux alentours de 7,5 et 50 µg de protéines/ml respectivement (Figure 3 A. et B.).

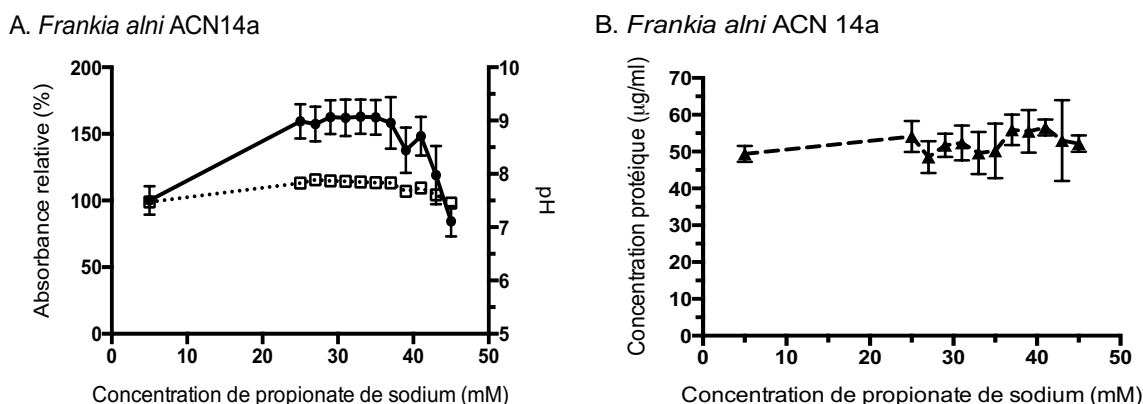


Figure 3: Détermination plus précise du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez *Frankia alni* ACN 14a (A. et B.) en présence de diverses concentrations de propionate de sodium. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et

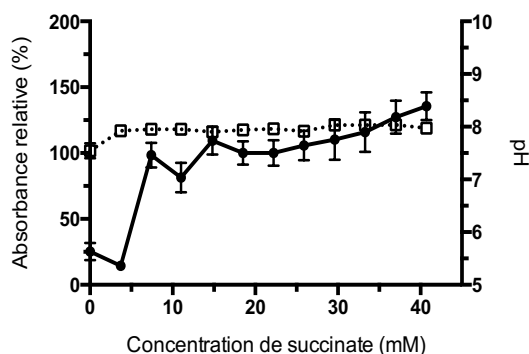
elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS et elle est représentée par (●) (A.) et la prise des pH est représentée par (□) (A.). La concentration protéique, obtenue par la méthode de Bradford et révélée à 595 nm, est représentée par (▲) (B).

3.3.1.3 Détermination de la capacité d'induction d'hyphes toruleux pour la souche *Frankia* sp. ACN10a avec du sodium succinate hexahydrate

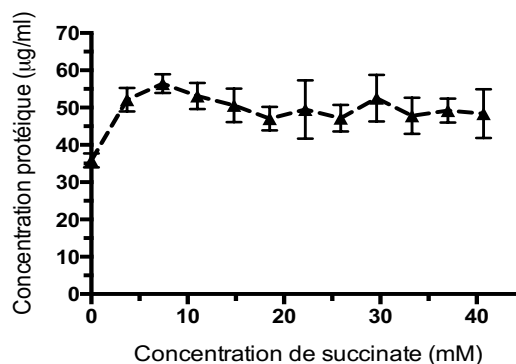
Dans les sections précédentes (3.3.1.1 et 3.3.1.2), il a été démontré que la source de carbone préférentielle (le propionate de sodium) chez *Frankia alni* ACN14a, induisait le phénotype RTH à une concentration de 50 mM. Dans cette section, *Frankia* sp. ACN10a sera mis en présence de différentes concentrations de sodium succinate hexahydrate, sa source de carbone préférentielle (S.Roy, données non-publiées), afin de déterminer si l'induction en hyphes toruleux se produit au même titre que l'utilisation du propionate de sodium chez *Frankia alni* ACN14a. Nous avons aussi évalué si la concentration de 19 mM (5 g/l de sodium succinate hexahydrate), utilisée présentement au laboratoire, est la plus optimale pour la croissance de *Frankia* sp. ACN10a. Comme illustré dans les figures 4 A. et C., des concentrations variant de 0 à 225 mM de sodium succinate hexahydrate ont été testées. On remarque que les concentrations de sodium succinate hexahydrate de 3,7 à 37,0 (Figures 4 A. et C.) sont autant optimales les unes que les autres en ce qui a trait à l'absorbance relative qui se situe aux alentours de 100 %. Le pH, quant à lui, augmente entre 0 mM et 3,7 mM de sodium succinate hexahydrate passant de 7,54 à 7,90 (Figure 4 A.) puis il demeure stable jusqu' à 56 mM, aux alentours de 7,90-8,00 (Figures 4 A. et C.). À partir de 56 mM de sodium succinate hexahydrate, le pH chute constamment pour atteindre 6,85 à 225 mM de sodium succinate hexahydrate (Figure 4 C.). La concentration protéique augmente entre 0 mM et 3,7 mM de sodium succinate

hexahydrate, passant de 35,8 à 52,0 μg de protéines/ml. Enfin, la concentration protéique varie entre 35 et 55 μg de protéines/ml entre 3,7 et 222 mM de sodium succinate hexahydrate (Figure 4 B. et D.). Indépendamment de la concentration de sodium succinate hexahydrate, aucune différenciation en hyphes toruleux n'a été observée en microscopie à épifluorescence (résultats non présentés).

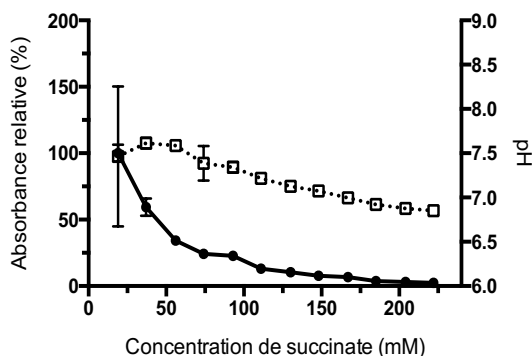
A. *Frankia* sp. ACN10a



B. *Frankia* sp. ACN10a



C. *Frankia* sp. ACN10a



D. *Frankia* sp. ACN10a

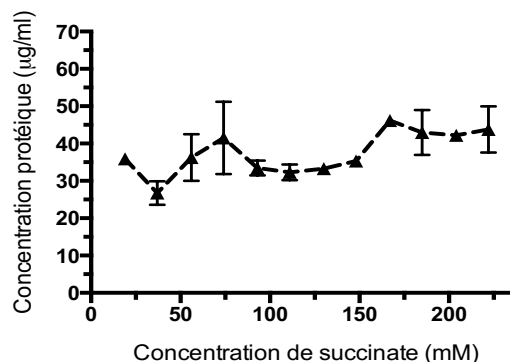


Figure 4: Effet de différentes concentrations de sodium succinate hexahydrate sur la viabilité de la souche *Frankia* sp. ACN10. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS, elle est représentée par (●) (A. et C.). Le pH est représenté par (□) (A. et C.). La concentration protéique, a été obtenue par la méthode de Bradford et a été révélée à 595 nm, elle est représentée par (▲) (B. et D.).

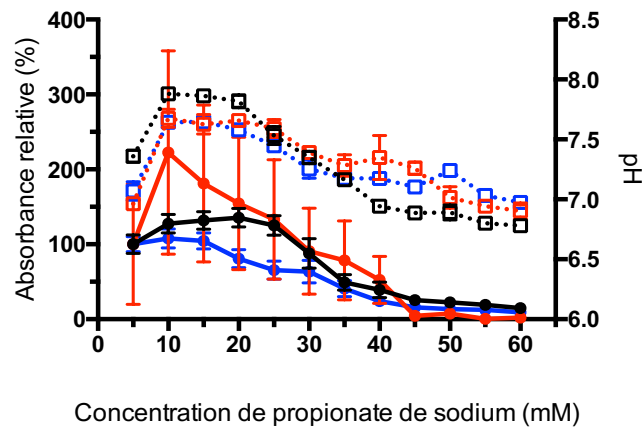
3.3.1.4 Impact du temps (2, 4 et 8 semaines) et de 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a

L'utilisation de 50 mM propionate de sodium induit le phénotype RTH après 2 semaines d'incubation (section 3.3.1.1). Dans cet essai nous avons voulu déterminer si l'induction du phénotype RTH était toujours possible ou même optimale après 4 et 8 semaines d'incubation avec différentes concentrations de propionate de sodium. On remarque, à la figure 5 A., que l'absorbance relative augmente de 100 % à 140 % entre 10 et 30 mM de propionate de sodium après 4 semaines d'incubation tandis qu'une diminution constante de l'absorbance relative est observée à la semaine 2 (Figure 5 A.). À la semaine 8, aucune différence significative n'est observée par rapport aux semaines 2 et 4 (Figure 5 A.). Par ailleurs, le pH, à chacune des semaines, augmente légèrement jusqu'à 7,50 entre 5 mM et 10 mM de propionate de sodium, puis redescend tranquillement à mesure que la concentration en propionate de sodium augmente (Figure 5 A.). La concentration protéique suit le même patron à chacune des semaines, elle augmente légèrement entre 5 mM et 10 mM puis redescend tranquillement à mesure que la concentration en propionate de sodium augmente (Figure 5 B.).

En microscopie à épifluorescence, la différenciation en hyphes toruleux a été observée aux semaines 2, 4 et 8 en présence de 50 mM de propionate de sodium (Figure 6 A., B. et C.). Le pourcentage de viabilité des cellules en présence de 50 mM de propionate de sodium reste le même aux alentours de 70 à 80 %. Le pourcentage de cellules différenciées est aussi le même, c'est-à-dire entre 70 et 80 %. La seule différence notable que l'on peut observer est l'apparence des hyphes toruleux à 8

semaines (Figure 6 C.). Les cellules uniques de RTH sont plus grosses et semblent plus relâchées (Figure 6 C.).

A. *Frankia alni* ACN14a



B. *Frankia alni* ACN14a

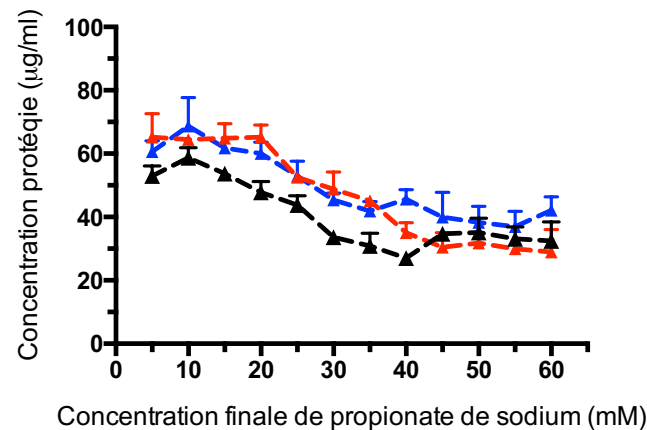


Figure 5: Impact du nombre de semaine d'incubation et de la concentration en propionate de sodium sur la différenciation en hyphes torueux de *Frankia alni* ACN14a. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS aux semaines 2 (●), 4 (●) et 8 (●) (A.) La prise des pH a été faite aux semaines 2 (□), 4 (□) et 8 (□). La concentration protéique a été

obtenue par la méthode de Bradford et qui a été révélée à 595 nm, aux semaines 2 (▲), 4 (▲) et 8 (▲) (B.).

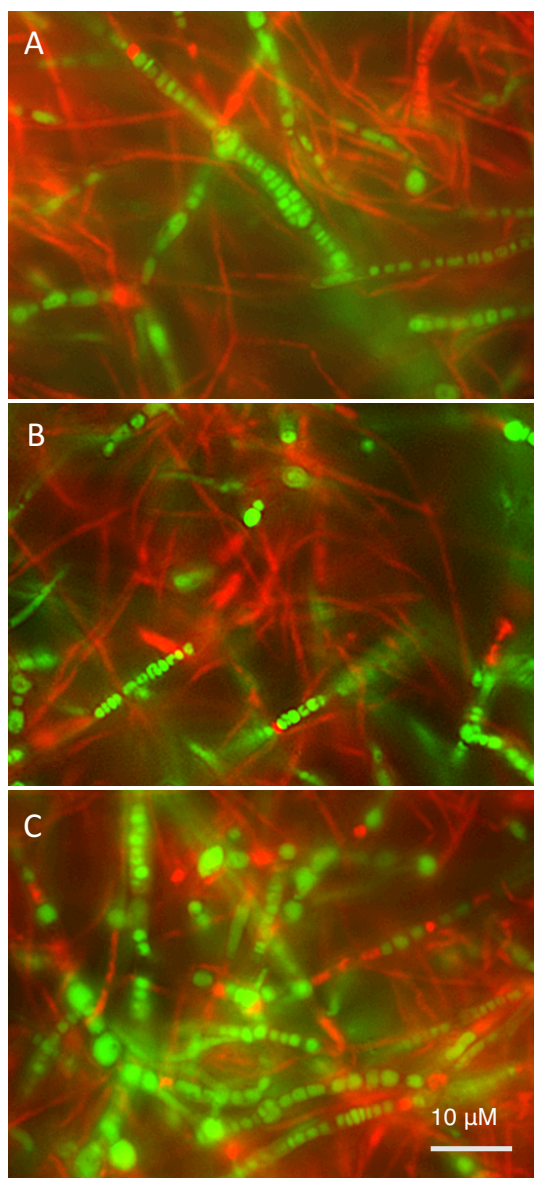


Figure 6: Essais de différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a en présence de 50 mM de propionate de sodium à 2, 4 et 8 semaines. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement

total de 1000x de cellules colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, après 2 (A.), 4 (B.) et 8 (C.) semaines d'incubation à la température pièce.

3.3.1.5 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KH_2PO_4 sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a

Dans cet essai nous avons voulu savoir si le fait de combiner 2 agents inducteurs connus pour induire la différenciation en RTH, soit le KH_2PO_4 et le propionate de sodium, allait permettre une meilleure différenciation en hyphes toruleux et une mort cellulaire moins importante (Bernèche-D'Amours, 2012). À pH 6,70 on note que l'absorbance relative de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KH_2PO_4 reste la même aux alentours de 100 % (Figure 7 A.). Par contre, lorsque le propionate de sodium n'est pas ajouté à diverses concentrations de KH_2PO_4 , on observe une diminution de l'absorbance relative de 100 % à 50 % à partir de 35 mM de KH_2PO_4 (Figure 7 A.). Le pH est stable à 6,80 lorsqu' on combine les 2 agents inducteurs et lorsque le KH_2PO_4 est utilisé seul (Figure 7 A.). Par ailleurs, la concentration protéique reste relativement stable entre 15 et 20 μg de protéines/ml (Figure 7 C.). À pH 5,85, on note que l'absorbance relative résultant de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KH_2PO_4 reste la même aux alentours de 100 % (Figure 7 B.). Par contre, lorsque diverses concentrations de KH_2PO_4 sans propionate de sodium sont utilisées, on observe une augmentation de l'absorbance relative à partir de 35 mM de KH_2PO_4 qui passe de 100 % à 175 %, puis une brusque diminution de l'absorbance relative à 60 mM de KH_2PO_4 qui revient alors à 100 % (Figure 7 B.). Le pH est stable aux alentours de 6,00 lorsque l'on combine les 2 agents inducteurs. Par

contre, lorsque diverses concentrations de KH_2PO_4 sont utilisées seules, on remarque une augmentation du pH jusqu'à 7,00 entre 10 et 20 mM, puis ce dernier redescend entre 6,00 et 6,10 (Figure 7 B.). La concentration protéique est stable à environ 10 μg de protéines/ml entre 0 et 80 mM de KH_2PO_4 combinés à 50 mM de propionate de sodium puis elle augmente à 12 μg de protéines/ml entre 90 et 110 mM de KH_2PO_4 (Figure 7 D.).

En microscopie à épifluorescence, la différenciation en RTH se produit, comme prévu, en présence de 50 mM de propionate de sodium et de 5 mM de KH_2PO_4 à pH 6,70 (Figure 8 A.). La différenciation est aussi observée en présence de 50 mM de propionate de sodium et de 50 mM de KH_2PO_4 à pH 6,70 (Figure 8 B.). Comme attendu, on observe une différenciation en RTH lorsqu'on utilise 50 mM de KH_2PO_4 (Figure 8 C.). Par contre, lorsque l'on combine 50 mM de propionate de sodium à 50 mM de KH_2PO_4 à pH 5,85, la différenciation en RTH est absente (Figure 8 D.).

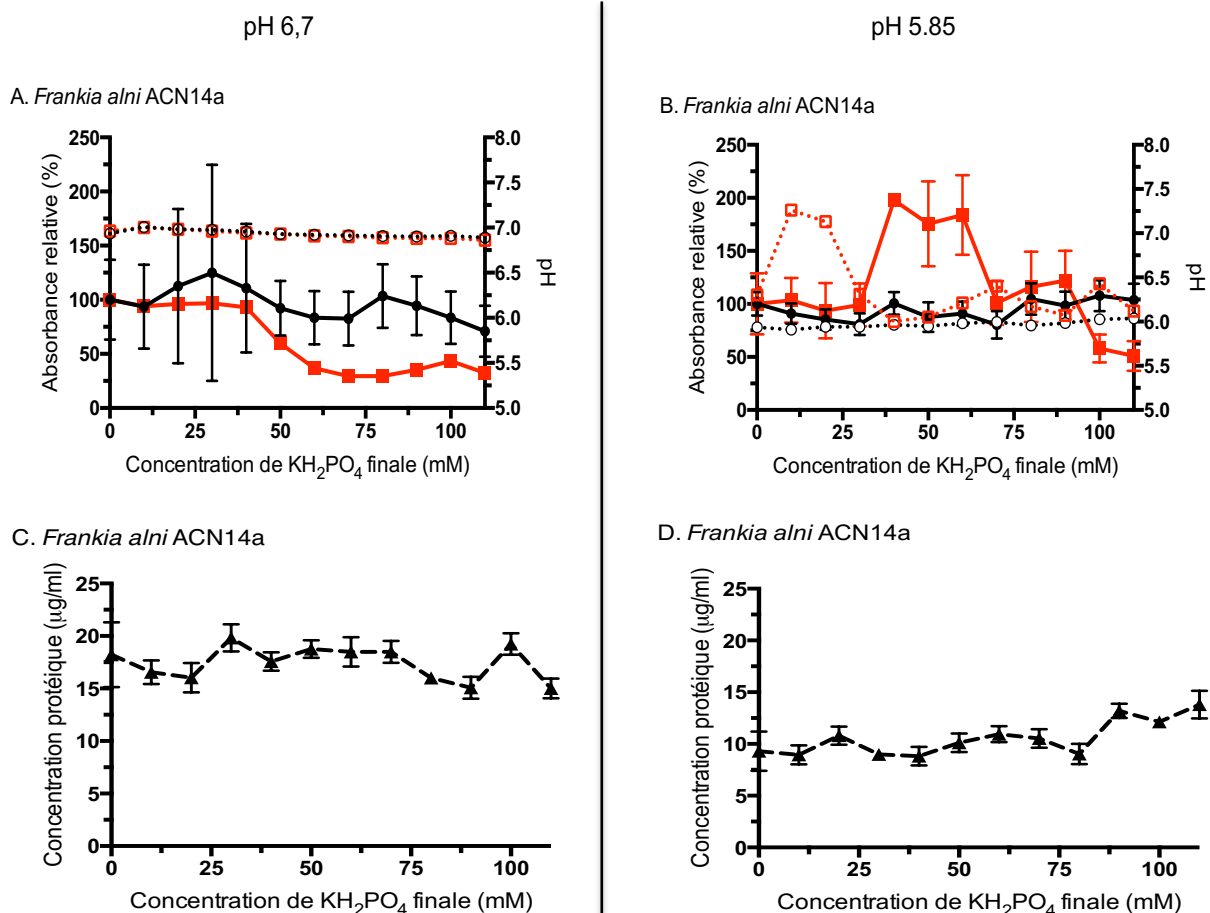


Figure 7: Effet du KH_2PO_4 et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium à différentes concentrations de KH_2PO_4 à différents pH sur la viabilité de *Frankia alni* ACN14a. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire, elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations de KH_2PO_4 et est représentée par (●). En présence de diverses concentrations de KH_2PO_4 sans propionate de sodium, elle est représentée par (■) à pH 6,70 (A.) et à pH 5,85 (B.). La prise des pH en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations de KH_2PO_4 est représentée par (○) ainsi qu'en présence de diverses concentrations de KH_2PO_4 sans propionate de sodium, elle est représentée par (□) à pH 6,70 (A.) et à pH 5,85 (B.). La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford et elle a été révélée à 595 nm, en présence de 50 mM de propionate de sodium et en présence de diverses

concentrations de KH_2PO_4 sans propionate de sodium (▲) à pH 6,70 (C.) et à pH 5,85 (D.)

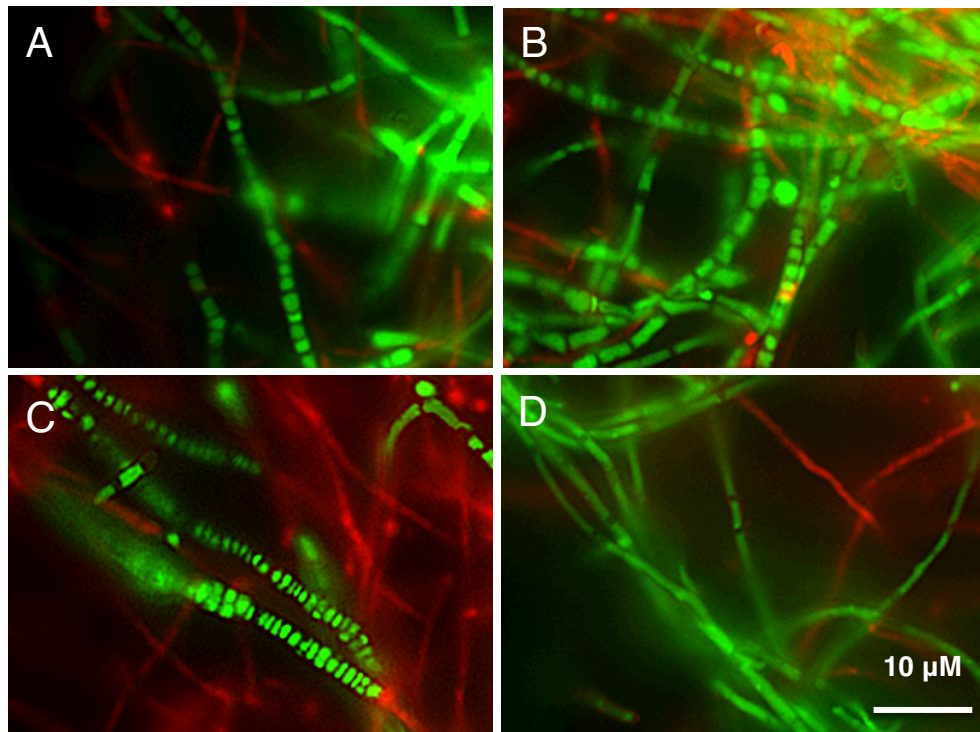


Figure 8: Impact du KH_2PO_4 seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différentes concentrations de KH_2PO_4 à différents pH sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, en milieu BAPS 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (A.), en milieu BAPS 50 mM de propionate de sodium et 50 mM de KH_2PO_4 à pH 6,70 (B.) à pH 5,85 (D.), en milieu BAPS 50 mM de KH_2PO_4 à pH 5,85 (C.).

3.3.1.6 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KCl sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a

Dans cet essai nous avons voulu savoir si le fait de combiner deux agents inducteurs connus, soit le KCl et le propionate de sodium, pour induire la différenciation en RTH allait permettre une meilleure différenciation en hyphes toruleux et une mort cellulaire moins importante (Bernèche-D'Amours, 2012). À pH 6,70 on note que l'absorbance relative de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KCl reste la même aux alentours de 100 % (Figure 9 A.). Par contre, lorsque diverses concentrations de KCl seulement sont utilisées, on observe une diminution importante de l'absorbance relative dès 10 mM de KCl qui passe de 100 % à 15 % (Figure 9 A.). Le pH est stable aux alentours de 6,70 lorsque l'on combine les deux agents inducteurs. Par contre, lorsque le KCl est utilisé seul, le pH est stable aussi mais aux alentours de 7,75. Par ailleurs, en présence de 50 mM de propionate de sodium et diverses concentrations de KCl, la concentration protéique varie légèrement entre 12 et 16 µg de protéines/ml, (Figure 9 C.). À pH 5,85 on note que l'absorbance relative de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations de KH_2PO_4 diminue graduellement jusqu'à 80 % à mesure que la concentration en KCl augmente. Puis, lorsque diverses concentrations de KCl seulement sont utilisées, on observe une diminution drastique de l'absorbance relative à partir de 10 mM de KCl qui passe de 100 % à 10 %. (Figure 9 B.). Le pH est stable aux alentours de 5,85 lorsque l'on combine les 2 agents inducteurs. Par contre, lorsque diverses concentrations de KCl sont utilisées seules, on remarque une augmentation du pH jusqu'à 7,00 entre 10 et 20 mM, puis ce dernier redescend entre 6,00 et 6,10 (Figure 9 B.). La concentration protéique est stable entre 5 et 10 µg de protéines/ml (Figure 9 D.)

En microscopie à épifluorescence, la différenciation en RTH se produit comme prévu en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (Figure 10 A.) et en présence de 50 mM de KCl à pH 5,85 (Figure 10 C.). Par contre, aucune différenciation en RTH n'est observée, autant à pH 6,70 qu'à pH 5,85, lorsque 50 mM de propionate de sodium sont combinés avec n'importe laquelle des concentrations de KCl utilisées (Figure 10 B. et D.).

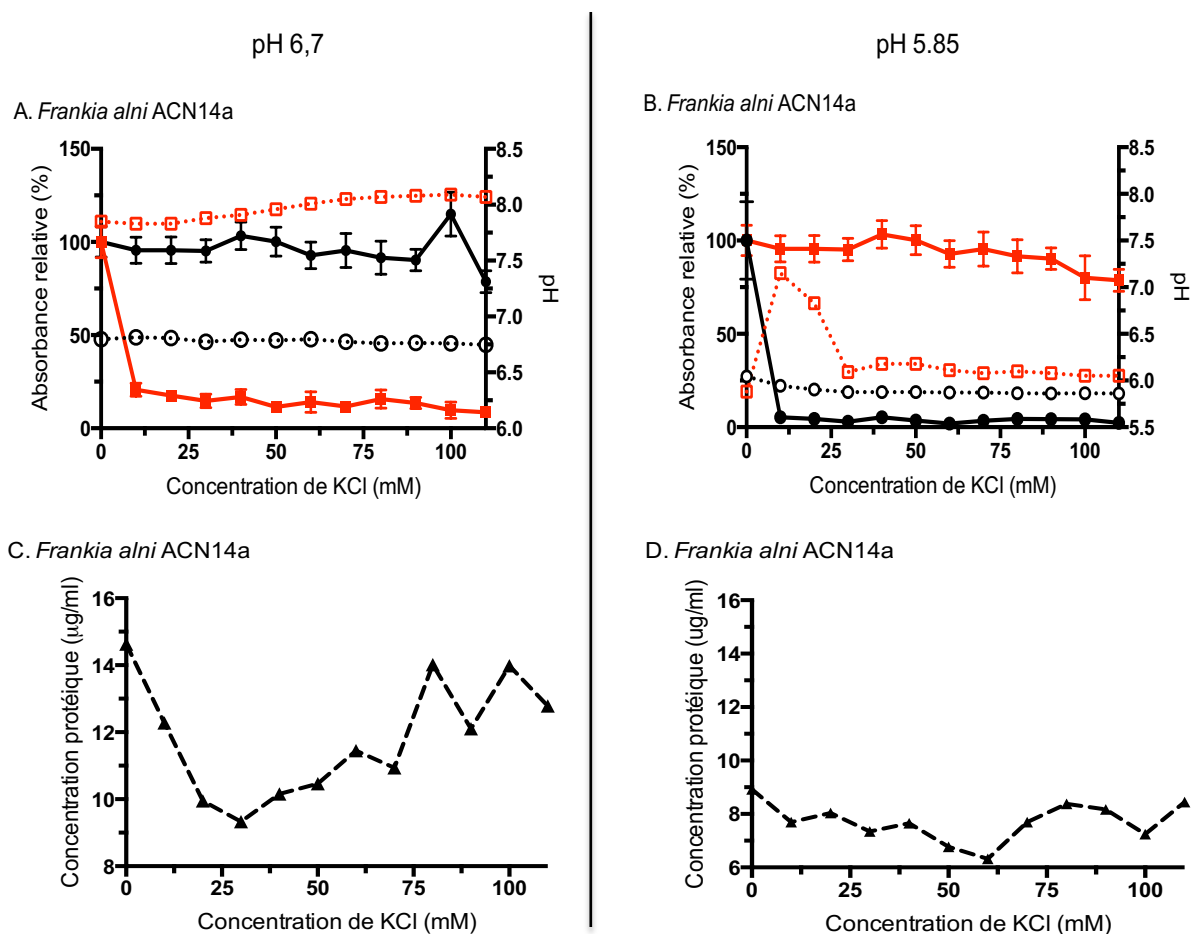


Figure 9: Effet du KCl et de la combinaison de 50 mM propionate de sodium à différentes concentrations de KCl à différents pH sur la viabilité de *Frankia alni* ACN14a. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS en présence de 50 mM de propionate de sodium

et de diverses concentrations de KCl est représentée par (●) ainsi qu'en présence de diverses concentrations de KCl sans propionate de sodium est représentée par (■) à pH 6,70 (A.) et à pH 5,85 (B.). La prise des pH en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations de KCl est représentée par (◦) ainsi qu'en présence de diverses concentrations de KCl sans propionate de sodium est représentée par (◻) à pH 6,70 (A.) et à pH 5,85 (B.). La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford et elle a été révélée à 595 nm, en présence de 50 mM de propionate de sodium et en présence de diverses concentrations de KCl sans propionate de sodium (▲) à pH 6,70 (C.) et à pH 5,85 (D.).

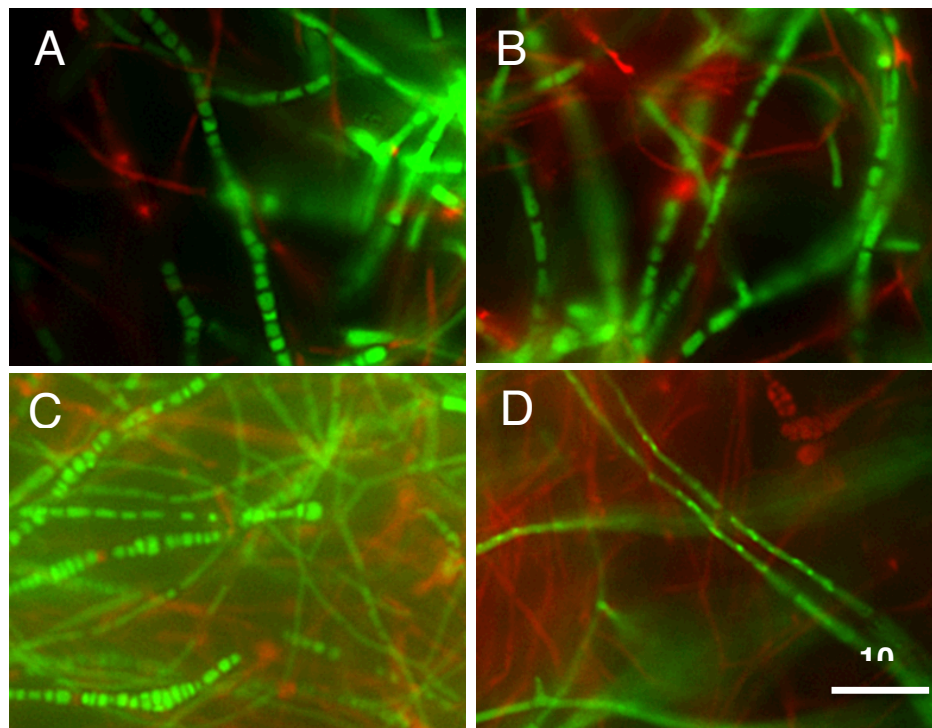


Figure 10: Impact du KCl seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec différentes concentrations de KCl à différents pH sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x

de cellules colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, en milieu BAPS 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (A.), en milieu BAPS 50 mM de propionate de sodium et 50 mM de KCl à pH 6,70 (B.) et à pH 5,85 (D.), en milieu BAPS 50 mM de KCl à pH 5,85 (C.).

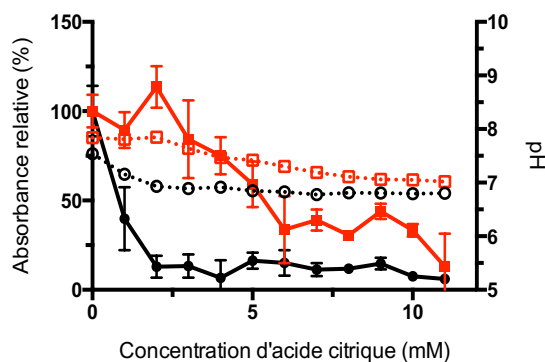
3.3.1.7 Détermination de l'effet de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec diverses concentrations d'acide citrique sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a

Les essais de combinaison de 50 mM propionate de sodium avec différents agents inducteurs ont pour objectifs de cibler des concentrations optimales pour la différenciation en RTH sans toutefois entraîner une mort cellulaire aussi importante que celle observée dans le milieu BAPS modifié (Bernèche D'Amours, 2012). Ainsi, en présence de 50 mM de propionate de sodium et de 20 mM d'acide citrique, la respiration cellulaire chute drastiquement, passant de 100 % à 25 % (Figure 11 C.). Le pH diminue légèrement de 7,00 à 6,70 en présence de 50 mM de propionate de sodium à partir de 20 mM d'acide citrique puis il reste stable à 6,70 à mesure que les concentrations d'acide citrique augmentent (Figure 11 C.). La concentration protéique reste stable aux alentours de 15 µg de protéines/ml en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations d'acide citrique (Figure 11 D.). Par la suite, nous avons voulu déterminer ce qui se produisait dans la zone de chute drastique de la respiration cellulaire, soit entre 0 et 11 mM d'acide citrique (Figure 11 A.). Ainsi, on remarque une diminution drastique de 100 % à 25 % de la respiration cellulaire à partir de 1 mM d'acide citrique combiné à 50 mM de propionate de sodium. Le pH diminue légèrement de 7,25 à 6,90-7,00 en présence 50 mM de propionate de sodium combinés à diverses concentrations d'acide citrique. La

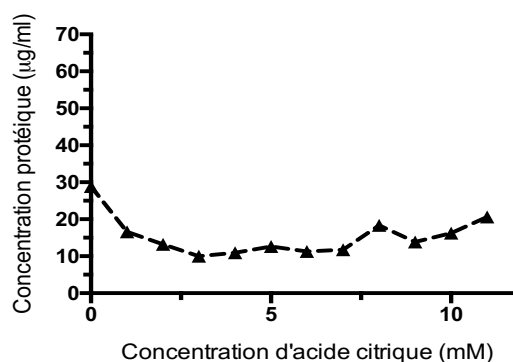
concentration protéique est élevée au départ à 30 µg de protéines/ml, puis elle diminue graduellement à 10 µg de protéines/ml entre 1 et 7 mM d'acide citrique combinés à 50 mM de propionate de sodium.

Les résultats de microscopie à épifluorescence montrent que lorsque 40 mM d'acide citrique est utilisé seul, aucune différenciation n'est observée (Figure 12 A.). Par contre, lorsque 50 mM de propionate de sodium est combiné avec une concentration de 40 mM d'acide citrique, une différenciation en RTH est observée (Figure 12 B.).

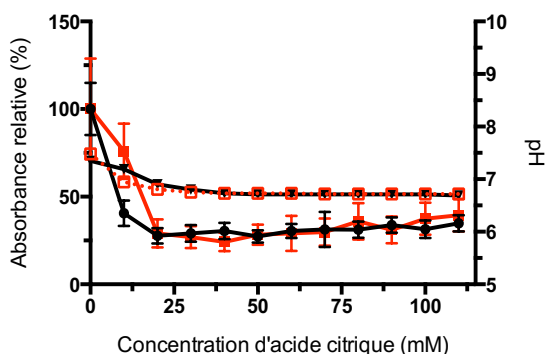
A. *Frankia alni* ACN14a



B. *Frankia alni* ACN14a



C. *Frankia alni* ACN14a



D. *Frankia alni* ACN14a

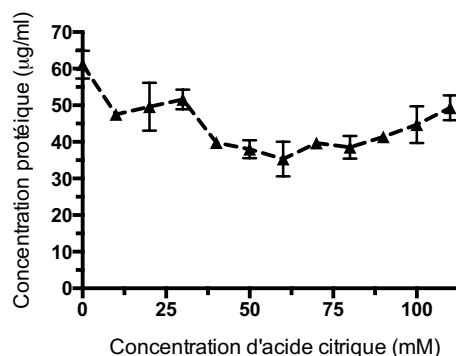


Figure 11: Effet de l'acide citrique seul et de la combinaison de 50 mM propionate de sodium à différentes concentrations d'acide citrique à différents pH sur la viabilité de

Frankia alni ACN14a. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations d'acide citrique est représentée par (●) ainsi qu'en présence de diverses concentrations d'acide citrique sans propionate de sodium est représentée par (■) de 0 à 11 mM (A.) et de 0 à 110 mM (C.). La prise des pH en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations d'acide citrique est représentée par (°) ainsi qu'en présence de diverses concentrations d'acide citrique sans propionate de sodium est représentée par (□) de 0 à 11 mM (A.) et de 0 à 110 mM (C.). La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford et elle a été révélée à 595 nm, en présence de 50 mM de propionate de sodium et en présence de diverses concentrations d'acide citrique sans propionate de sodium (▲) de 0 à 11 mM (B.) et de 0 à 110 mM (D.).

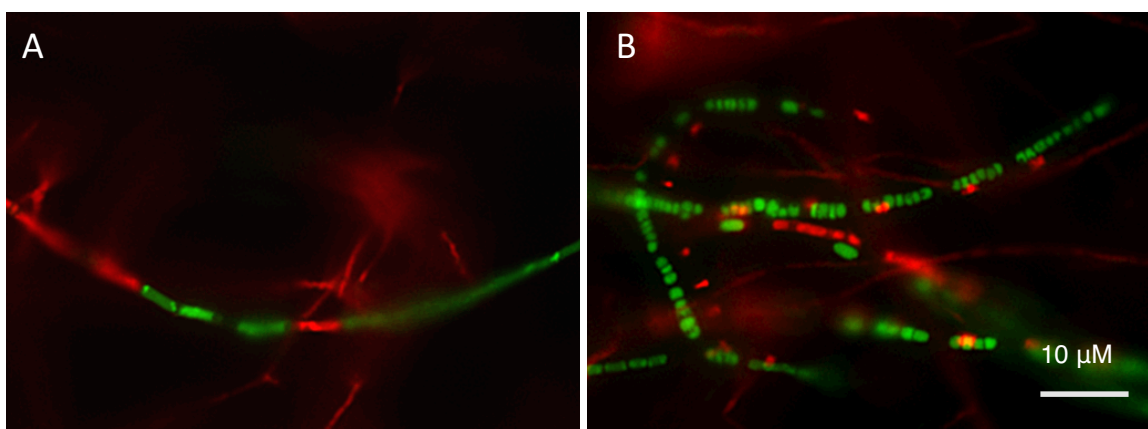


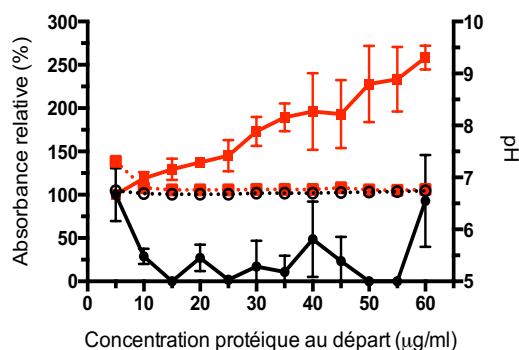
Figure 12: Impact de l'acide citrique seul et de la combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec 40 mM d'acide citrique sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules de *Frankia alni* ACN14a colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, après 2 semaines de

croissance en présence de 40 mM d'acide citrique (A.) et en présence de 40 mM d'acide citrique combinés avec 50 mM de propionate de sodium (B.).

3.3.2 Effet de la biomasse combiné à 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux

Les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) avaient permis de déterminer que les concentrations de 15 µg de protéines/ml en microplaques ou de 5µg de protéines/ml en erlenmeyers, en présence de 50 mM de KH_2PO_4 , étaient les seules qui permettaient une différenciation massive en RTH. Au-delà de ces concentrations, le pourcentage de matériel différencié en RTH était moindre ou tout simplement inexistant (Bernèche D'Amours, 2012). Le but de cet essai était de savoir si la présence de 50 mM de propionate de sodium allait permettre la différenciation en RTH à des concentrations de biomasse élevée (jusqu'à 60 µg de protéines/ml). Après 2 semaines d'incubation, la respiration cellulaire augmente de 100 % à 250 % avec la concentration protéique utilisée au départ lorsque les cellules sont cultivées dans du BAPS régulier. Par contre, dès que 50 mM de propionate de sodium sont présents, la respiration cellulaire chute de 100 % à 25 %. Le pH reste stable vers 6,75 avec ou sans 50 mM de propionate de sodium (Figure 13 A.). La concentration protéique augmente à mesure que la concentration de protéines de départ augmente en présence de 50 mM de propionate de sodium (Figure 13 B.). Les résultats de microscopie ne révèlent pas une différenciation massive en RTH à des concentrations protéiques élevées. On observe une différenciation en RTH à 15 µg de protéines/ml (Figure 14 A.). Puis, à partir de 20 µg de protéines/ml, aucune différenciation en RTH n'est observée (Figure 14 B.).

A. *Frankia alni* ACN14a



B. *Frankia alni* ACN14a

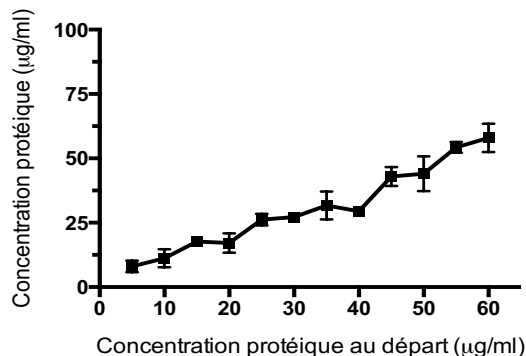


Figure 13: Effet de la biomasse combiné avec 50 mM propionate de sodium sur la viabilité de *Frankia alni* ACN14a. L'absorbance relative représente la respiration cellulaire et elle est révélée à 490 nm grâce au réactif MTS/PMS en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations de biomasse est représenté par (●) ainsi qu'en présence de diverses concentrations de de biomasse sans propionate de sodium est représenté (■). La prise des pH en présence de 50 mM de propionate de sodium et de diverses concentrations de biomasses est représentée par (◦) ainsi qu'en présence de diverses concentrations de biomasse sans propionate de sodium est représentée par (◻). La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford et elle a été révélée à 595 nm, en présence de 50 mM de propionate de sodium et en présence de diverses concentrations de biomasse sans propionate de sodium (▲).

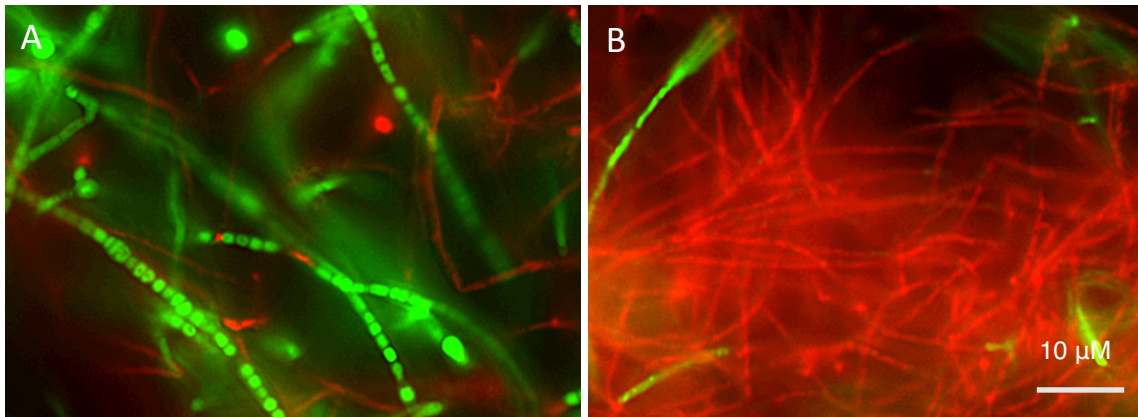


Figure 14: Impact de la concentration de biomasses au départ et de 50 mM de propionate de sodium sur la différenciation en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a. Observations de 10 champs microscopiques par microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules de *Frankia alni* ACN14a colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, après 2 semaines de croissance en présence de 50 mM de propionate de sodium à 15 µg de protéines/ml au départ (A.) et à 20 µg de protéines/ml au départ (B.).

3.4 Discussion

3.4.1 Détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium chez *Frankia alni* ACN 14a, *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1

Le but premier de ce chapitre était de déterminer quelle concentration de propionate de sodium était bactériostatique pour la croissance de *Frankia alni* ACN14a avant d'effectuer des essais en bioréacteur de 2,2 l. La détermination du seuil bactériostatique du propionate de sodium a été effectuée en microplaques en testant

des concentrations de plus en plus élevées de propionate de sodium (0 à 100 mM) sur *Frankia alni* ACN14a. Ainsi, la respiration cellulaire (représentée par l'absorbance relative) augmentait jusqu'à 30 mM et elle chutait à 39 mM (Figure 3 A.). Cette chute de respiration cellulaire était accompagnée d'une différenciation importante en hyphes toruleux à 50 mM de propionate de sodium. Bernèche-D'Amours (2012) avait obtenu une différenciation en hyphes toruleux en présence de 50 mM de KH_2PO_4 à pH 5,85. Lorsqu'elle avait essayé de produire les hyphes toruleux à pH 6,70, la différenciation n'avait tout simplement pas eu lieu. Par contre, dans ce mémoire, la production des hyphes toruleux a été possible en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (Figure 2 A.). Le KH_2PO_4 est un agent osmotique qui entraîne une augmentation de la concentration des ions K^+ dans le milieu extracellulaire (milieu hypertonique) (Murray *et al.*, 2013). Ces ions sont les cations majeurs retrouvés dans le milieu intracellulaire des bactéries. Ainsi, l'ajout de KH_2PO_4 crée un choc osmotique important lorsqu'il est ajouté à une concentration finale de 50 mM dans le milieu de culture (Epstein, 2003). Cela a créé un stress cellulaire, mais qui ne semble pas assez important chez *Frankia alni* ACN14a, pour induire une différenciation en RTH à pH 6,70. C'est en combinant 50 mM de KH_2PO_4 à un pH de 5,85 que les cellules sont assez stressées pour se différencier en RTH (Bernèche-D'Amours, 2012). À l'instar de *Streptomyces coelicor* qui entre plus rapidement en phase stationnaire de croissance et par le fait même produit ses métabolites secondaires plus rapidement lorsque le pH chute drastiquement lorsqu'il est cultivé en bioréacteur (Kim *et al.*, 2009), *Frankia alni* ACN14a pourrait nécessiter un pH acide en plus d'un choc osmotique pour pouvoir se différencier en RTH. Il a été observé que 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 induit une différenciation massive en RTH (Figure 1 A.). Le propionate de sodium possède deux formes, la forme protonée, soit l'acide propionique, et la forme anionique, le propionate. Étant un acide gras à courte chaîne, l'acide propionique peut passer librement à travers la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, ce dernier libère son proton, ce qui

occasionne une diminution du pH intracellulaire et, par le fait même, occasionne un stress important chez les cellules. L'action protonophore du propionate de sodium pourrait créer un stress assez important chez *Frankia alni* ACN14a même à pH 6,70 pour induire une différenciation en hyphes toruleux (Rocco, 2010). Il a été observé que les microorganismes semblent tolérer davantage le propionate de sodium à pH 6,70 que le KH_2PO_4 à pH 5,85. En effet, les cellules présentaient un pourcentage de viabilité aux alentours de 70 à 80 % en plus d'une différenciation massive en RTH lorsqu'elles étaient induites par 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 (Figure 2 A.). Par contre, lorsque les cellules ont été induites par le KH_2PO_4 à pH 5,85, elles présentaient une viabilité de 30 à 40 % en plus d'une différenciation massive (Bernèche D'Amours, 2012). Il a déjà été démontré dans la littérature que la viabilité de *Frankia* sp. est moindre lorsqu'elle est cultivée à pH acide, ce qui pourrait expliquer la viabilité diminuée de *Frankia alni* ACN14a lorsqu'elle est cultivée à pH 5,85 (Faure-Raynaud *et al.*, 1986). En effet, le seuil bactériostatique du propionate de sodium pour *Frankia alni* ACN14a a été établi à 39 mM tandis que la concentration permettant la différenciation massive en RTH est de 50 mM de propionate de sodium. Finalement, ceci renforce l'idée que c'est la présence d'une concentration bactériostatique de propionate de sodium (50 mM) qui permet la différenciation en RTH en plus de nuire à la croissance des microorganismes.

Comme la différenciation de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 n'avait jamais été observée en milieu BAPS modifié, les travaux présentés dans ce manuscrit ont été ramifiés en essayant diverses concentrations de propionate de sodium sur ces souches (Lafond Lambert, 2014). Comme observé aux figures 2 B. et C., aucune de ces souches ne présentait une différenciation en hyphes toruleux en présence de propionate de sodium, malgré une chute de la respiration cellulaire en présence de concentrations supérieures à 5 mM de propionate de sodium (Figure 1 C. et E.). Les

souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 sont différentes de *Frankia alni* ACN14a par leur gène *rpoB*, mais sont identiques au niveau de l'ADN ribosomal 16S (Bernèche-D'Amours *et al.*, 2011). Par ailleurs, Bernèche-D'Amours (2011) avait dressé une liste de gènes potentiellement impliqués dans la différenciation en RTH chez *Frankia alni* ACN14a. De cette liste, 10 gènes sélectionnés par Lafond-Lambert (2014) (annexe 1) ont été utilisés pour des analyses de q-PCR. Ces gènes ont été sélectionnés dû à leur fonction métabolique dans la formation des spores chez *Streptomyces* spp. Par ailleurs, Lafond-Lambert (2014) a déterminé quels gènes étaient sur- ou sous-exprimés chez *Frankia alni* ACN14a lors de sa différenciation en hyphes toruleux. Les gènes *kdpC* et *FRAAL2024* sont sur-exprimés en conditions inductrices et les gènes *thiC* et *FRAAL2827* sont sous-exprimés. Les 2 premiers gènes sont impliqués dans le transport du potassium ainsi que dans la réponse face aux chocs osmotiques. Les gènes *thiC* et *FRAAL2827* sont respectivement impliqués dans la production de thiamine pyrophosphate et dans les protéines de transfert de lipides (Lafond Lambert, 2014). Ceci concorde avec le milieu BAPS modifié qui provoque chez *Frankia alni* ACN14a un choc osmotique important par sa concentration élevée en KH_2PO_4 . Une comparaison entre les 10 gènes sélectionnés par Lafond-Lambert (2014) a été faite entre *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a par Laroche-Villeneuve (2015). Cette étude a révélée que tous les gènes sont identiques mis à part le gène *FRAAL3767* (Laroche-Villeneuve, 2015).

3.4.2 Essais d'induction d'hyphes toruleux chez la souche *Frankia* sp. ACN10a avec diverses concentrations de sodium succinate hexahydrate

Comme mentionné précédemment, le propionate de sodium est la source de carbone préférentielle de *Frankia alni* ACN14a tandis que le sodium succinate hexahydrate

l'est pour la souche *Frankia* sp. ACN10a (S. Roy, données non-publiées). Puisque que le propionate de sodium chez *Frankia alni* ACN14a induit une différenciation en RTH, nous avons voulu savoir si le sodium succinate hexahydrate avait le même effet chez *Frankia* sp. ACN10a. En effet, plusieurs changements morphologiques, comme la production de spores ou de vésicules, peuvent être produits chez *Frankia* sp. lorsque différentes sources de carbone sont ajoutées dans le milieu de culture (Tisa *et al.*, 1983). Par exemple, chez la souche *Frankia* sp. Cpl1, la formation de vésicules ainsi que l'induction de l'enzyme nitrogénase se produisent seulement lorsque l'azote est exempt du milieu de culture et que du malate, du fumarate ou du sodium succinate hexahydrate sont utilisés comme source de carbone (Tisa *et al.*, 1983 ; Schwintzer Tjepkema, 2012). Tisa *et al.* (1983) ont démontré que la formation de sporanges et de spores, chez *Frankia* sp. Cpl1, était possible seulement lorsque le propionate de sodium ou le sodium succinate étaient utilisés comme seule source de carbone. De plus, l'utilisation d'extraits de levure, à des concentrations supérieures à 0,25 %, comme source de nutriments réduisait considérablement la production de sporanges et de spores (Tisa *et al.*, 1983). Par ailleurs, nous avons pu confirmer que la concentration de sodium succinate utilisée au laboratoire (19 mM) était optimale pour la croissance (Figure 4 A. et C.). Par contre, malgré une chute de l'absorbance relative à partir de 40 mM de sodium succinate hexahydrate, aucune différenciation en hyphes toruleux n'a été notée chez *Frankia* sp. ACN10a en présence de diverses concentrations de sodium succinate hexahydrate. Cela signifie que celui-ci n'a pas de rôle à jouer dans l'induction de la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia* sp. ACN10a.

3.4.3 Combinaison de 50 mM de propionate de sodium avec divers agents physiques (temps et biomasse) et chimiques (KH_2PO_4 , KCl et acide citrique) sur la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a

À la lumière des résultats qui ont été obtenus dans la section 3.3.1.1, il était primordial d'approfondir les connaissances sur les agents physiques et chimiques qui pouvaient induire le morphotype toruleux chez *Frankia alni* ACN14a. Tout d'abord, l'effet du temps a été évalué quant à l'impact qu'il pouvait avoir sur la différenciation en hyphes toruleux lorsque *Frankia alni* ACN14a a été mis en présence de diverses concentrations de propionate de sodium. Il a été observé qu'une augmentation de l'absorbance relative est présente entre la semaine 2 et 4, probablement due à une consommation de tous les nutriments présents dans le milieu. Il a également été observé que l'absorbance relative chutait entre la semaine 4 et 8, causé par une diminution, voire une absence de nutriments ainsi qu'une augmentation des déchets dans le milieu de culture (Figure 5 A.). Par ailleurs, en microscopie on remarquait une différenciation en RTH en présence de 50 mM de propionate de sodium à chacune des semaines de croissance (Figure 6 A., B., et C.). On avait noté un aspect plus relâché des hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a à la semaine 8, probablement causé par le vieillissement (Figure 6 C.). En effet, chez les bactéries se trouvant en phase stationnaire ou de déclin de croissance, certaines modifications morphologiques comme la production d'endospores ou encore une diminution du volume de la cellule ont été observées, ce qui pourrait expliquer l'apparence relâchée des cellules à la semaine 8 (Prescott *et al.*., 2013).

Par la suite, la combinaison de deux agents inducteurs connus pour induire la différenciation en RTH, soit le KH_2PO_4 et le propionate de sodium, a été testée afin

de voir si elle pouvait optimiser la différenciation, que ce soit en augmentant la quantité de cellules vivantes différenciées ou en supprimant le pH acide de la recette élaborée par Bernèche-D'Amours (2012) pour produire des RTH. Dans un premier temps, il a été observé qu'une différenciation en RTH se produisait à pH 6,70 lorsque 50 mM de propionate de sodium et 50 mM de KH_2PO_4 étaient combinés (Figure 8 B.). Lorsque chacun des agents inducteurs a été testé séparément, une différenciation en RTH a été observée avec du propionate de sodium à pH 6,70 (Figure 8 A.) contrairement à aucune induction en RTH lorsque le KH_2PO_4 à pH 6,70 a été utilisé (résultats non présentés). Ainsi, il est possible de confirmer que c'est l'effet du 50 mM propionate de sodium dans la combinaison 50 mM propionate de sodium/50 mM de KH_2PO_4 qui induit la différenciation en hyphes toruleux. Cette expérience a aussi été réalisée à un pH de 5,85, le pH où Bernèche-D'Amours (2012) avait obtenu des hyphes toruleux. Lorsque 50 mM de propionate de sodium ont été combinés à 50 mM de KH_2PO_4 à pH 5,85, il n'y avait aucune différenciation en hyphes toruleux (Figure 8 D.). Par ailleurs, lorsque 50 mM de propionate de sodium à pH 5,85 a été utilisé seul, aucune différenciation en RTH n'a été observée (résultats non présentés) contrairement à une différenciation massive lorsque 50 mM de KH_2PO_4 a été utilisé seul (Figure 8 D.). Il semblerait que la combinaison de ces deux agents inducteurs à pH 5,85 empêche la différenciation en RTH. Il a déjà été démontré que le genre *Frankia* est sensible à des pH acides (Faure-Raynaud *et al.*, 1986). En effet, ces microorganismes se développent à des pH voisins de la neutralité. La présence d'une grande quantité d'ions H^+ dans le milieu extracellulaire du microorganisme rend difficile la conservation d'un pH avoisinant la neutralité dans son milieu intracellulaire, ce qui cause un stress important (Faure-Raynaud *et al.*, 1986). Il se pourrait que l'effet combiné du choc osmotique, occasionné par le KH_2PO_4 , l'action intracellulaire du propionate de sodium ainsi que le pH acidifié qui cause un stress trop important chez les microorganismes serait ce qui a entraîné une absence de différenciation en hyphes toruleux (Rocco, 2010).

Puis, 50 mM de propionate de sodium ont été combinés avec diverses concentrations de KCl afin de voir s'il y avait un impact sur la différenciation en hyphes toruleux. Dans les travaux de Lafond-Lambert (2014), le KCl avait démontré un potentiel inducteur de RTH. En effet, en présence de 40 mM de KCl à pH 5,85, 40 % des cellules étaient vivantes et présentaient une différenciation en hyphes toruleux de 90 % (Lafond-Lambert, 2014). Lorsque les 2 agents inducteurs ont été utilisés indépendamment, ils ont permis une différenciation en RTH. En effet, 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70 permet la différenciation en RTH (Figure 10 A.) ainsi que 50 mM de KCl à pH 5,85 (Figure 10 C.). Par contre, lorsque les 2 agents inducteurs ont été combinés autant à pH 6,70 qu'à pH 5,85 aucune différenciation ne s'est produite (Figure 10 B. et D.). À pH 6,70, les microorganismes présentaient des septations un peu plus abondantes que celles retrouvées sur les hyphes végétatifs (Figure 10 B.), mais ces dernières n'étaient néanmoins pas caractéristiques de celles des hyphes toruleux. L'effet combiné des 2 agents inducteurs inhibe la différenciation en hyphes toruleux. Il se pourrait que le choc osmotique soit trop important, tant à pH 5,85 qu'à pH 6,70 pour induire la différenciation. Précédemment il a été démontré que le KH_2PO_4 induit une différenciation en hyphes toruleux en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70. Contrairement au KH_2PO_4 , le KCl ne possède pas de groupement PO_4^- . Le phosphate est un élément important pour de nombreuses fonctions cellulaires tel que pour la structure cellulaire, le stockage d'information ainsi que pour la production d'énergie (Blank, 2012). Il se pourrait que le choc osmotique causé par le KH_2PO_4 et le propionate de sodium soit le même que celui causé par le KCl et le propionate de sodium, mais que la différenciation en RTH ne se produise pas en présence de KCl et de propionate de sodium car en plus d'être stressées, les cellules ne bénéficiaient pas du phosphate en aussi grande quantité pour leurs fonctions cellulaires.

Il a été démontré précédemment par Lafond-Lambert (2014) que l'acide citrique inhibait la fonctionnalité du cycle TCA et par le fait même entraînait une inhibition de la différenciation en hyphes toruleux. Il a aussi été observé dans la littérature qu'un débalancement dans les composantes du cycle TCA entraînait des répercussions morphologiques et physiologiques chez les bactéries. Par exemple, Viollier (2001) a démontré qu'un cycle TCA fonctionnel est essentiel pour les premières étapes de la sporulation et de la formation du mycélium aérien chez *Bacillus* sp. et chez *Streptomyces* sp. Chez *Bacillus subtilis*, une mutation de n'importe quel gène intervenant dans la production d'enzymes fonctionnelles du cycle TCA a des répercussions sur sa capacité de sporulation. Une mutation entraîne, dans la plupart des cas, une accumulation d'un intermédiaire et par le fait même, une acidification intracellulaire importante. Dès qu'un débalancement survient, il est détecté par le microorganisme et il s'en suit d'un blocage dans le cycle de la sporulation (Viollier *et al.*, 2001). Dans les essais effectués à la section 2.3.1.7, il semblerait que la combinaison de 2 intermédiaires du cycle TCA, soit l'acide citrique et le propionate de sodium, provoque un rétablissement du cycle TCA et une différenciation en RTH. On peut remarquer que lorsque 40 mM d'acide citrique ont été ajoutés au milieu de culture qu'aucune différenciation en RTH ne se produisait (Figure 12 A.). Par contre, lorsque 40 mM d'acide citrique ont été combinés avec 50 mM de propionate de sodium que la différenciation en hyphes toruleux était à nouveau possible (Figure 12 B.).

Finalement, nous avons testé différentes concentrations de biomasse de départ (jusqu'à 60 µg de protéines/ml) en présence de 50 mM de propionate de sodium. Bernèche-D'Amours (2012) a effectué cette expérience avec *Frankia alni* ACN14a en utilisant du BAPS modifié. Les résultats obtenus à la section 2.3.2 se sont révélés être les mêmes que ceux que Bernèche-D'Amours (2012) avait obtenus avec le

BAPS modifié, c'est-à-dire une absence de différenciation en hyphes toruleux lorsque la densité cellulaire est plus grande que 15 µg de protéines/ml. Certains mécanismes cellulaires, comme la production de molécules antibiotiques chez *Streptomyces* sp., ou l'élaboration de biofilm, seraient la résultante des interactions entre les cellules, aussi connues sous le nom de quorum sensing (Horinouchi et Beppu, 1990; Fuqua *et al.*, 1994; Wisniewski-Dyé et Downie, 2002). Chez *Myxococcus xanthus*, la présence d'une grande densité de cellules favorise la sporulation ainsi que la formation de fructifications (Gill et Cull, 1986). Au même titre que chez *M. xanthus*, le quorum sensing pourrait venir jouer un rôle sur le cycle morphologique de *Frankia alni* ACN14a. À l'inverse de *M. xanthus*, le quorum sensing pourrait venir inhiber la différenciation en hyphes toruleux lorsque les cellules sont présentes en grande concentration (supérieure à 15 µg de protéines/ml). De plus, une étude réalisée par Lawton *et al.* (1989) a démontré que la quantité de spores présentes dans l'inoculum de départ de nombreuses souches de *Streptomyces* influence le morphotype du microorganisme. Ces derniers se présentaient sous la forme d'agrégats de mycélium lorsque la quantité de spores au départ était grande et sous la forme de pellets compact lorsque la quantité de spores au départ était faible (Lawton *et al.*, 1989). Ceci pourrait expliquer pourquoi il a été impossible d'obtenir le morphotype toruleux lorsque les cellules étaient cultivées à une grande concentration (résultats non présentés).

CHAPITRE 4 : OPTIMISATION DES CONDITIONS CULTURALES EN BIORÉACTEUR DE 2,2 l POUR ÉTUDIER ET POUR PRODUIRE DES HYPHES TORULEUX

4.1 Mise en contexte

Les premières observations des hyphes toruleux se sont produites en microplaques lorsque des puits contenant 50 mM de KH_2PO_4 (pH 5,85) ont été inoculés avec une concentration de 15 μg de protéines/ml (Bernèche-D'Amours, 2012). Lorsque des essais en erlenmeyer de 1 l ont été effectués afin d'observer le même patron de différenciation, aucune différenciation en hyphes toruleux n'était observée. C'est en diminuant la concentration protéique de 15 à 5 μg de protéines/ml que la même différenciation en hyphes toruleux a pu être observée en erlenmeyer de 1 l (Bernèche-D'Amours, 2012). Étant donné que les microplaques et les erlenmeyers ont été incubés exactement de la même façon, soit à la température pièce, à l'abri de la lumière et sans aucune agitation, il a été présumé que le seul facteur qui différait pourrait être la concentration d'oxygène dissout. En effet, la dissolution de l'oxygène en microplaques est beaucoup plus efficace étant donné un rapport surface/volume élevé par rapport à celui retrouvé en erlenmeyer de 1 l. Cela pourrait expliquer pourquoi une plus grande concentration de cellules (15 μg de protéines/ml) est inductible en microplaques, mais pas en erlenmeyer. C'est pour cela que dans les essais en bioréacteur de 2,2 l, la concentration d'oxygène a été modulée, afin d'observer une différenciation en hyphes toruleux.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Souche bactérienne utilisée, préparation des inocula, milieux de cultures utilisés, microscopie à épifluorescence et évaluation de la respiration cellulaire des cultures

La souche bactérienne utilisée dans ce chapitre est *Frankia alni* ACN14a (ULQ0102014010). Cette souche provient de la collection du Pr. Maurice Lalonde du Centre d'étude de la forêt de l'Université Laval (Normand et Lalonde, 1982). Les codes alphanumériques rattachés à chacune des souches sont une numérotation arbitraire établie par Normand et Lalonde (1982). Le milieu de culture utilisé, la préparation des inocula, la préparation des bioréacteurs, la microscopie à épifluorescence, ainsi que l'évaluation de la respiration cellulaire des cultures par l'addition du réactif MTS-PMS ont été décrits dans les sections matériel et méthodes des chapitres 2 et 3.

4.2.4 Essai de différenciation en hyphes toruleux à différentes concentrations en oxygène dissout avec le KH_2PO_4 comme agent inducteur, en bioréacteur de 2,2 l

Les bioréacteurs ont été inoculés à 15 µg de protéines/ml. Aucun ajout n'a été fait dans le bioréacteur mis à part de l'acide sulfurique 1M (H_2SO_4) pour maintenir le pH à 6,70. Durant la phase de latence et de croissance exponentielle, les paramètres utilisés sont ceux décrits dans le tableau 1 de la section matériel et méthode du

chapitre 2. Durant les phases stationnaire et de déclin, les paramètres utilisés sont présentés dans le tableau 3. Des échantillons ont été prélevés dans le bioréacteur pour évaluer la concentration de protéines grâce à la méthode de Bradford et la viabilité cellulaire par microscopie à épifluorescence grâce à la coloration *LIVE/DEAD®*. Puis, lorsque la phase stationnaire a été atteinte (au jour 14), une solution stérile de KH_2PO_4 a directement été ajoutée dans le bioréacteur de l'essai 1 et 2 afin d'atteindre une concentration finale de 50 mM de KH_2PO_4 , changeant le milieu BAPS pour un milieu BAPS modifié (Bernèche D'Amours, 2012). Par la suite, des échantillons ont été prélevés jusqu'à l'occurrence de 10 jours (après l'ajout de la solution de KH_2PO_4) pour évaluer la différenciation en hyphes toruleux par microscopie à épifluorescence grâce au colorant *LIVE/DEAD®*.

Tableau 1: Paramètres utilisés pour la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a en bioréacteur de 2,2 l après l'ajout de KH_2PO_4 pour créer un milieu BAPS modifié (Bernèche-D'Amours , 2012).

	Essai 1	Essai 2
Paramètres	Valeur	Valeur
Température (°C)	TP	TP
Agitation (RPM)	0	150
Unité de pH	5,85	5,85
Oxygène dissout (%)	0	60
Flux d'oxygénation (l/min)	0	2
Ajout	Aucun	Aucun

4.3 Résultats

4.3.1 Résultats obtenus dans le bioréacteur où tous les paramètres ont été fixés à 0 après l'ajout de KH_2PO_4 (essai 1)

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si la différenciation en RTH était possible dans un bioréacteur qui était en quelque sorte converti en erlenmeyer après l'ajout du KH_2PO_4 . Plus précisément, un bioréacteur où l'agitation, le maintien de la température et de l'oxygène dissout avaient été fixés à 0. Par ailleurs, l'ajout de l'agent inducteur, le KH_2PO_4 , a eu lieu dans la phase stationnaire/ de déclin de croissance (Figure 1, flèche rouge) comme proposé dans le chapitre 2. En microscopie à épifluorescence, on remarque une faible différenciation en hyphes toruleux de l'ordre de 10 %, 2 jours après l'ajout du KH_2PO_4 , avec une viabilité cellulaire de l'ordre de 60 % (Figure 2 A.). Une observation 5 jours après l'ajout de KH_2PO_4 , a présenté une différenciation semblable à celle observée 2 jours après l'ajout, mais avec pourcentage de viabilité cellulaire de 10 % (Figure 2 B.).

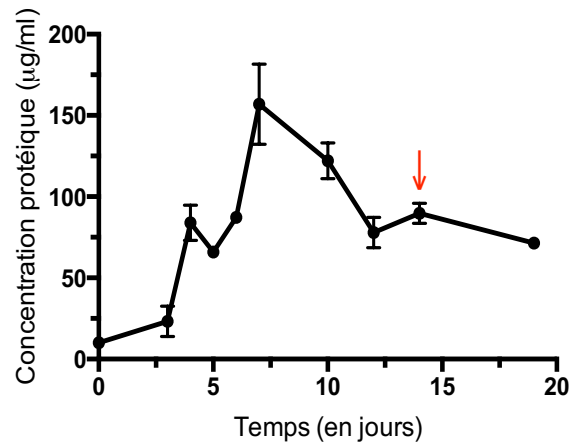


Figure 1: Courbe de croissance de *Frankia alni* ACN14a lorsqu'elle a été cultivée en bioréacteur de 2,2 l. Flèche rouge: représente l'ajout de KH_2PO_4 pour obtenir une concentration finale de 50 mM dans le bioréacteur.

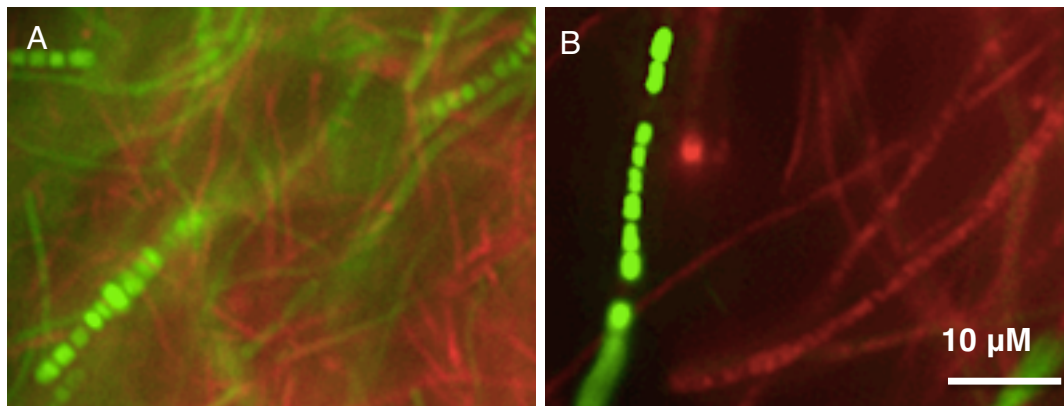


Figure 2: Formation d'hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a après l'ajout de KH_2PO_4 à une concentration finale de 50 mM dans un bioréacteur de 2,2 l. Observations faites en microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules de *Frankia alni* ACN14a colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, 2 jours après l'ajout de 50 mM de KH_2PO_4 dans le bioréacteur avec les paramètres présentés dans le Tableau 1 de ce chapitre (essai 1) (A.) et 5 jours après l'ajout de 50

mM de KH_2PO_4 dans le bioréacteur avec les paramètres présentés dans le Tableau 1 (essai 1) (B.).

4.3.2 Bioréacteur où les paramètres ont été maintenus et où l'oxygène dissout a été fixé à 60 % après l'ajout de KH_2PO_4 (essai 2)

L'expérience effectuée à la section 4.3.1 nous a permis de constater que de fixer tous les paramètres à 0 cause probablement une anoxie dans les cellules, ce qui se traduisait par une mort cellulaire importante (Figure 2 B.). Dans cet essai, l'agitation est maintenue et la concentration d'oxygène dissout est diminuée à 60 % (Tableau 1, essai 2). Par ailleurs, l'ajout de l'agent inducteur, le KH_2PO_4 , a été effectué dans la phase stationnaire/ de déclin de croissance (Figure 3, flèche rouge) comme proposé dans le chapitre 1. On a remarqué que lors de l'ajout de l'agent inducteur que la concentration protéique diminuait graduellement de 90 μg de protéines/ml à 60 μg de protéines/ml (Figure 3). En microscopie à épifluorescence, on a remarqué une faible différenciation en hyphes toruleux de l'ordre de 10 % accompagné d'une viabilité cellulaire de 70 %, 2 jours après l'ajout du KH_2PO_4 (Figure 4 A.). Une observation en microscopie à épifluorescence 5 jours après l'ajout de KH_2PO_4 a dévoilé une différenciation semblable à celle observée 2 jours après l'ajout, avec un pourcentage de viabilité de 50 % (Figure 4 B.).

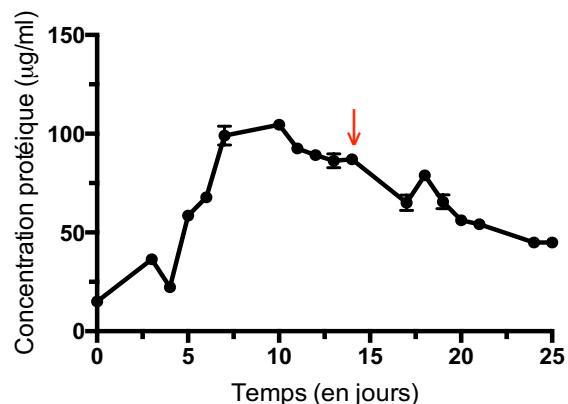


Figure 3: Courbe de croissance de *Frankia alni* ACN14a lorsqu'elle a été cultivée en bioréacteur de 2,2 l. Flèche rouge: représente l'ajout de KH_2PO_4 pour obtenir une concentration finale de 50 mM dans le bioréacteur.

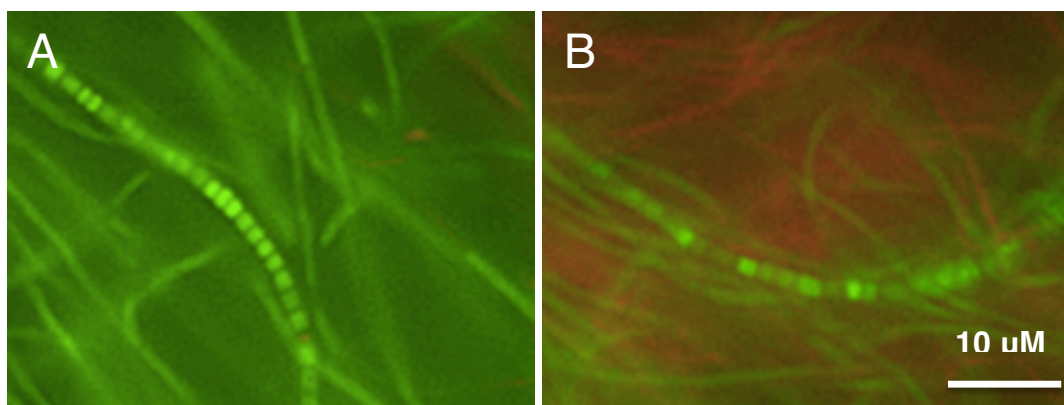


Figure 4: Formation d'hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a après l'ajout de KH_2PO_4 à une concentration finale de 50 mM dans un bioréacteur de 2,2 l. Observations faites en microscopie à épifluorescence à un grossissement total de 1000x de cellules de *Frankia alni* ACN14a colorées avec le colorant *LIVE/DEAD®*, 2 jours après l'ajout de 50 mM de KH_2PO_4 avec les paramètres présentés dans le Tableau 1 de ce chapitre (essai 2) (A.), et 5 jours après l'ajout de 50 mM de KH_2PO_4 avec les paramètres présentés dans le Tableau 1 (essai 2) (B.).

4.4 Discussion

Frankia sp. est un microorganisme microaérophile, ce qui implique qu'il a besoin d'une quantité relativement faible d'oxygène, de l'ordre de 2 à 10 %, pour permettre sa croissance de façon optimale (Normand, 2006; Prescott *et al.*, 2013). Le régime métabolique de ce microorganisme, lorsqu'il est cultivé en erlenmeyer, est moins actif que celui retrouvé lorsque les microorganismes se développent en bioréacteur de 2,2 l. En effet, les conditions retrouvées en bioréacteur sont conçues pour favoriser un régime métabolique optimal afin de produire le plus de biomasse possible. Une concentration en oxygène dissout (fixé à 80 %) supérieure à celle normalement consommée par *Frankia* sp. est donc nécessaire afin de supporter le métabolisme accéléré des bactéries. Chez de nombreux microorganismes, la quantité d'oxygène dissout est essentielle pour la production de métabolites secondaires (Chen et Wilde, 1991; Clark et Bushell, 1995). Par exemple, chez *Saccharopolyspora erythraea* la production d'antibiotiques est intimement liée à la concentration en oxygène dissout. En effet, la production de l'érythromycine nécessite une limitation en oxygène dissout et en glucose, tandis que la production de vancomycine par ce même microorganisme a besoin d'une concentration d'oxygène dissout de 60 % (Clark et Bushell, 1995). Il se produit le même phénomène chez *Streptomyces* sp. P6621-RS1726, c'est-à-dire que la production de céphamycine C est optimale lorsque le niveau d'oxygène dissout est à 10 % lors du pic de production (Okabe *et al.*, 1992).

Chez *Frankia alni* ACN14a, la concentration en oxygène dissout a été modulée dans le bioréacteur de 2,2 l afin de cibler des concentrations où la différenciation en hyphes toruleux se produirait. Dans un premier temps, la totalité des paramètres a été coupée après l'ajout du KH_2PO_4 (Tableau 1, essai 1) afin de recréer

l'environnement retrouvé en erlenmeyer de BAPS modifié. La différenciation a été amorcée 3 jours après l'ajout (Figure 2 A.) puis, 5 jours plus tard on a noté le même taux de différenciation (Figure 2 B.), mais avec une proportion de cellules mortes de 90 %. Le fait de couper totalement l'oxygène a été trop drastique pour les cellules qui ont probablement subi un choc anoxique, ce qui expliquerait la mort cellulaire aussi importante au jour 5 (Figure 2 B.). Lors du deuxième essai, les paramètres de culture sont restés les mêmes, mis à part la concentration d'oxygène dissout qui a été ajustée à 60 % (Tableau 1, essai 2) après l'ajout de du KH_2PO_4 . La différenciation en RTH a été amorcée 3 jours après l'ajout de KH_2PO_4 et elle est restée stable à 10 % de différenciation (Figure 4 A.). Par contre, la proportion de cellules vivantes était plus importante que celle observée lors de l'essai 1, elle tournait aux alentours de 50 % (Figure 4 B.). On remarque dans les 2 essais que la différenciation en hyphes toruleux s'amorce tranquillement au jour 3, mais qu'elle ne se produit pas de façon massive. La concentration en oxygène dissout, à l'instar de nombreux autres microorganismes tel que *S. erythraea*, semble jouer un rôle important dans le cycle de vie de *Frankia alni* ACN14a puisque c'est en modulant cette concentration que nous avons été en mesure de remarquer une faible (de l'ordre de 10 %) différenciation en hyphes toruleux. La concentration en oxygène dissout optimale pour la différenciation massive de *Frankia alni* ACN14a en hyphes toruleux n'a néanmoins pas été ciblée dans ce manuscrit.

Par ailleurs, il pourrait être intéressant de tester diverses concentrations de CO_2 dissous afin de voir l'effet sur la différenciation en hyphes toruleux. Il a déjà été prouvé dans la littérature qu'une concentration de 1 % de CO_2 en bioréacteur avait un impact sur l'activité de la nitrogénase et par le fait même sur la production de vésicules chez *Frankia* sp. HFPArI3 (Murry *et al.*, 1984). Au même titre que les vésicules, les hyphes toruleux sont des structures différenciées en réponse à un

changement dans l'environnement et qui pourraient être induits par une concentration de CO₂ plus importante que celle normalement retrouvée dans l'air ambiant.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Frankia sp. possède plusieurs types de morphologie. Les hyphes toruleux sont l'une de ces dernières et elles n'ont été étudiées qu'une seule fois dans la littérature par Diem et Dommergues (1985). Dans cet article, les auteurs ne mentionnent pas de façon claire et précise le rôle de ces hyphes. Néanmoins, ils ont spéculé sur les rôles probables de ces structures dans la reproduction et dans la lutte du microorganisme face aux stress environnementaux. Plusieurs années plus tard, Bernèche-D'Amours (2012) a mis au point un milieu de culture BAPS modifié présentant une concentration de 50 mM en KH_2PO_4 ainsi qu'un pH acidifié. Ce milieu de culture permet la différenciation de la presque totalité des cellules vivantes en hyphes toruleux. Lafond-Lambert (2014) a ensuite approfondi les connaissances sur les hyphes toruleux en variant les paramètres du milieu de culture pour comprendre si c'était le potassium, le phosphate, le pH acidifié ou un mélange entre ces divers paramètres qui permettaient la différenciation. Il a été démontré que ce serait le choc osmotique causé par le KH_2PO_4 ainsi que le pH acidifié qui permettait la différenciation en hyphes toruleux chez la souche *Frankia alni* ACN14a. L'utilisation séparée de ces deux paramètres ne causait pas une différenciation aussi massive que lorsqu'ils étaient combinés.

Dans ces travaux de maîtrise, l'impact de l'âge relatif de *Frankia alni* ACN14a sur sa capacité de différenciation en hyphes toruleux en erlenmeyer de 125 ml et en bioréacteur de 2,2 l a tout d'abord été évalué. Il s'est avéré que l'état physiologique du pré-inoculum avait un rôle crucial à jouer dans la différenciation en hyphes toruleux. Les expériences réalisées en erlenmeyers de 125 ml ont démontré que les microorganismes étaient incapables de se différencier en RTH lorsqu'ils étaient prélevés dans la phase de croissance exponentielle. Lorsque l'échelle de croissance

utilisée était un bioréacteur de 2,2 l, la même absence de différenciation en hyphes toruleux a également été observée durant la phase de croissance exponentielle. À leur sortie du bioréacteur, les microorganismes devaient être plongés en milieu BAPS régulier, puis en milieu BAPS modifié pour pouvoir être induits dans la phase de croissance exponentielle. Par contre, la différenciation en RTH n'était pas aussi massive que lorsque les microorganismes avaient été prélevés dans les autres phases de croissance. Par ailleurs, il serait intéressant de faire exactement ces mêmes expériences avec les souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 puisqu'elles ne se sont jamais massivement différenciées en RTH. Il est possible que les essais d'induction chez ces souches soient tout simplement fait au mauvais moment de leur phase de croissance et que l'induction de cellules possédant un état physiologique approprié entraîne alors une différenciation massive en RTH.

Les conditions de culture en microplaques pour produire et étudier les hyphes toruleux ont été optimisées. Dans ce chapitre nous avons observé une différenciation massive en hyphes toruleux lorsque *Frankia alni* ACN14a était en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70. Nous avons été en mesure de produire massivement les hyphes toruleux à un pH voisin de la neutralité (pH de 6,70), ce qui n'avait pas été possible dans les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) et de Lafond-Lambert (2014). Le pH acidifié serait le principal responsable de la mort cellulaire importante observée lorsque les microorganismes sont cultivés en milieu BAPS modifié. Lorsque *Frankia alni* ACN14a est induit en hyphes toruleux en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70, le pourcentage de viabilité est aux alentours de 70-80 % contrairement à 30-40 % lorsque *Frankia alni* ACN14a est induit en milieu BAPS modifié. Les souches de *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia* sp. Avcl1 ont été mises en présence de 50 mM de propionate de sodium à pH 6,70, mais elles ne sont pas différenciées en hyphes toruleux comme *Frankia alni* ACN14a.

Finalement, des essais d'optimisation des conditions culturales en bioréacteur de 2,2 l pour produire et étudier les RTH ont été effectués. C'est en abaissant à 60 % le taux d'oxygène dissout que la différenciation en hyphes toruleux a été amorcée. Par contre, le pourcentage différencié en hyphes toruleux de *Frankia alni* ACN14a a toujours été faible, soit de l'ordre de 10 %. Il serait intéressant de poursuivre les essais d'induction des hyphes toruleux en bioréacteur de 2,2 l en modifiant les concentrations d'oxygène dissout et en testant l'effet de l'utilisation de CO₂ ainsi que d'autres agents inducteurs tel le propionate de sodium sur la différenciation.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de mieux comprendre les mécanismes et les agents inducteurs qui permettent la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a. Éventuellement, la production d'hyphes toruleux à grande échelle en bioréacteur permettrait d'étudier fondamentalement ce morphotype. Dans des travaux futurs, il pourrait être intéressant d'isoler les hyphes toruleux de toutes les autres morphologies. La production des propagules uniques de RTH ouvrirait la voie à plusieurs applications telles que des études de transcriptomique, de reprises de croissance et de conjugaison bactérienne. De plus, il serait pertinent d'évaluer si des liens existent entre la différenciation en RTH et les conditions environnementales dans lesquelles se trouve *Frankia* sp. dans la nature, lorsque le microorganisme est saprophyte, en association libre dans le sol et en tant qu'endosymbionte avec des plantes actinorhiziennes.

ANNEXE

Annexe 1: Liste de tous les gènes sélectionnés par Lafond-Lambert (2014).

Gènes	Fonctions
<i>kdpC</i>	Transporteur de potassium
FRAAL2084	Transporteur de potassium
<i>sigH</i>	Régulateur transcriptionnel
FRAAL3730	Régulateur transcriptionnel
<i>ileS</i>	Isoleucyl-ARNt synthétase
<i>capD</i>	Modifications des carbohydrates
FRAAL2028	Modifications des carbohydrates
<i>thiC</i>	Production de thiamine pyrophosphate
FRAAL2827	Protéine de transfert de lipide
<i>atpD</i>	Sous unité β F ₀ F ₁ ATP synthase

BIBLIOGRAPHIE

Akkermans, A.D., Roelofsen, W., Blom, J., Huss-Danell, K., and Harkink, R. (1983). Utilization of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* in synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophae rhamnoides*, et *Datisca cannabina*. Can. J. of Bot. 61, 2793-2800.

Alyahya, S.A., Alexeter, R., Costa, T., Henriques, A.O., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2009). RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 1239-1244.

Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. and Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Eng. J. 5 (2), 109-114.

An, C.S., Riggsby, W.S., and Mullin, B.C. (1985). Relationships of *Frankia* isolates based on deoxyribonucleic acid homology studies. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 140-146.

Baker, D., Pengelly, W.L., and Torrey, J.G. (1981). Immunochemical analysis of relationships among isolated *Frankia* (Actinomycetales). Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 148-151.

Bassi, C.A., and Benson, D.R. (2007). Growth characteristics of the slow-growing actinobacterium *Frankia* sp. strain Ccl3 on solid media. Physiol. Plantarum 130, 391-399.

Beales, N.J. (2003). Adaptation of microorganisms to cold-temperature, weak acids preservatives, low-pH, and osmotic stress: A Review. Int. of food technol. 3, 1-20.

Bélanger, P-A. (2010). Étude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. et sa symbiose avec l'aulne noir (*Alnus Glutinosa* (L.) Gaertn). Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke.

Bélanger, P-A, Beaudin, J., and Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. J. Microbiol. Methods 85, 92-97.

Benson, D.R., and Dawson, J.O. (2007). Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. Physiol. Plantarum 130, 318-330.

Benson, D., and Eveleigh, D. (1979). Ultrastructure of the nitrogen-fixing symbiont of *Myrica pensylvanica* L. (bayberry) root nodules. Bot. Gaz. 140, 15-21.

Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol. Rev. 57, 293-319.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., et Gatto, G.J.(2013). Biochimie (Paris: Médecine-sciences publications).

Bernèche D'Amours, A. (2012). Étude de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia alni* ACN14a. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.

Bernèche-D'Amours, A., Ghinet, M.G., Beaudin, J., Brzezinski, R., and Roy, S. (2011). Sequence analysis of rpoB et rpoD gene fragments reveals the phylogenetic diversity of actinobacteria of genus *Frankia*. Can. J. Microbiol. 57, 244-249.

Berry, A.M., Harriott, O.T., Moreau, R.A., Osman, S.F., Benson, D.R., and Jones, A.D. (1993). Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 6091-6094.

Berry, A.M., Moreau, R.A., and Jones, A.D. (1991). Bacteriohopanetetrol: abundant lipid in *Frankia* cells et in nitrogen-fixing nodule tissue. Plant Physiol. 95, 111-115.

Blank, L.M. (2012). The cell et P: from cellular function to biotechnological application. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 846.

Blom, J. (1982). Carbon et nitrogen source requirements of *Frankia* strains. FEMS Microbiol. Lett. 13, 51-55.

Boor, K.J. (2006). Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. PLoS Biology 4, 18-20.

Bradley, S., and Carr, N.G. (1976). Heterocyst and nitrogenase development in *Anabaena cylindrica*. J. Gen. Microbiol. 96, 175-184.

Briere, J.J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Rustin, P. (2006). Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 291, C1114-20.

Burleigh, S., and Torrey, J.G. (1990). Effectiveness of different *Frankia* Cell types as *inocula* for the actinorhizal plant *Casuarina*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2565-2567.

Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annu. Rev. Biochem. 72, 77-109.

Chaia, E.E., Wall, L.G., and Huss-Danell, K. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review. *Symbiosis* 51, 201-226.

Chater, F.K. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial Dev.* 172:7, 89-115.

Chen H. C. and Wilde F. (1991). The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 37 (6), 591-595.

Clark, G.J., and Bushell, M.E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiol.* 141, 663-669.

Clemente, J.S., and Fedorak, P.M. (2005). A review of the occurrence, analyses, toxicity, and biodegradation of naphthenic acids. *Chemosphere* 60, 585-600.

Dawes, E.A., and Senior, P.J. (1973). The role et regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10, 135-266.

Demain A.L., Aharanowitz Y. and Martin J.F. (1983). Metabolite control of secondary biosynthetic pathways . *Biotechnol.* 49-67.

Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 87-93.

Diem, H.G., and Dommergues, Y.R. (1985). *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil* 87, 17-29.

El-Enshasy, H.A., Farid, M.A. and El-Sayed, S.A. (2000). Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40(5-6), 333-342.

Epstein, W. (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.* 75, 293-320.

Faure-Raynaud, M., Bonnefoy-Poirier, M., and Moiroud, A. (1986). Low pH influence on *Frankia* strains viability. *Plant Soil* 96, 347-358.

Fernie, A.R., Carrari, F., and Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 254-261.

Fontaine, M.S., Lancelle, S.A., and Torrey, J.G. (1984). Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFPAr13. J. Bacteriol. 160, 921-927.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176, 269-275.

Galinski, E-A. and Truper, H.G. (1994). Microbiol behavior in salt-stressed ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 15, 95–108.

Gaster, M., Nehlin, J.O., and Minet, A.D. (2012). Impaired TCA cycle flux in mitochondria in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects: Marker or maker of the diabetic phenotype? Arch. Physiol. Biochem. 118, 156-189.

Gill, R.E., and Cull, M.G. (1986). Control of developmental gene expression by cell-to-cell interactions in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 168, 341-347.

Golden, J.W., and Yoon, H. (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. Curr. Opin. Microbiol. 6, 557-563.

Haddock, A.B., and Jones, W.C. (1977). Bacterial respiration. Bacteriol. Rev. 41 (1), 47-99.

Haferburg, G., and Kothe, E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. J. Basic Microbiol. 47, 453-467.

Harris, S., and Silvester, W. (1992). Nitrogenase activity and growth of *Frankia* in batch and continuous culture. Can. J. Microbiol. 38, 296-302.

Harris, S., and Silvester, W. (1992). Oxygen controls the development of *Frankia* vesicles in continuous culture. New Phytol. 121, 43-48.

Hilgendorf, P., Heiser, V., Diekmann, H., and Thoma, M. (1987). Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: Applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 247-251.

Hogan, D., Vik, A. and Kolter, R. (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. Molecular microbiol. 54(5), 1212-1223.

Horinouchi, S., and Beppu, T. (1990). Autoregulatory factors of secondary metabolism and morphogenesis in actinomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. 10, 191-204.

- Igual, J., and Dawson, J. (1999). Stimulatory effects of aluminium *in vitro* growth of *Frankia*. *Can. J. of Bot.* 77, 1321-1326.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., and Wood, P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504, 179-195.
- Kim, Y.J., Moon, A.N., Song, J.Y., Kim, E.S., Kim, C.J., and Chang, Y.K. (2009). Gene-expression analysis of acidic pH shock effects on two-component systems in *Streptomyces coelicolor*. *Biotechnol. and Biop. Eng.* 14, 584-590.
- Krumholz, G.D., Chval, M.S., McBride, M.J., and Tisa, L.S. (2003). Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant Soil* 254, 57-67.
- Lafond-Lambert, C. (2014). La morphogénèse d'hyphe toruleux chez l'actinomycète *Frankia* spp. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- Lamont, H.C., Silvester, W.B., and Torrey, J.G. (1988). Nile red fluorescence demonstrates lipid in the envelope of vesicles from N₂-fixing cultures of *Frankia*. *Can. J. Microbiol.* 34, 656-660.
- Lancelle, S.A., Torrey, J., Hepler, P., and Callahan, D. (1985). Ultrastructure of freeze-substituted *Frankia* strain HFPCcl 3, the actinomycete isolated from root nodules of *Casuarina cunninghamiana*. *Protoplasma.* 127, 64-72.
- Laroche-Villeneuve, G. (2015). Étude génomique comparative de deux souches du genre *Frankia* isolées au Québec. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- Lawton, P., Withaker, A., and Odell, D. (1989). Actinomycetes morphology in shaken culture. *Can. J. Microbiol* 35, 881-889.
- Lechevalier, M.P. (1983). Cataloging *Frankia* strains. *Can. J. of Bot.* 61, 2964-2967.
- Lechevalier, M.P., Baker, D., and Horrière, F. (1983). Physiology, chemistry, serology, and infectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana* sub sp. *rugosa*. *Can. J. of Bot.* 61, 2826-2833.
- Lechevalier, M.P. (1994). Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *J. Syst. Bacteriol.* 44, 1-8.
- Loh, J., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Stacey, G., and Chatterjee, A. (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5, 285–29

Lopez, M.F., Fontaine, M.S., and Torrey, J.G. (1984). Levels of trehalose and glycogen in *Frankia* sp. HFPArl3 (Actinomycetales). Can. J. Microbiol. 30, 746-752.

Mallet, P-L. (2011). Impact des contaminants des sables résiduels de l'industrie pétrolière albertaine sur *Frankia* sp. et sa symbiose avec l'aulne. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke.

Mallet, P., and Roy, S. (2014). The Symbiosis between *Frankia* and alder shrubs results in a tolerance of the environmental stress associated with tailings from the canadian oil sets industry. J. Pet. Environ. Biotechnol. 5, 2.

Mathiensen, C., and Hägerhäll, C. (2003). The 'antiporter module' of respiratory chain Complex I includes the MrpC/NuoK subunit - a revision of the modular evolution scheme. FEBS Letters 549, 7-13.

Margolin, W. (2009). Sculpting the bacterial cell. Current Biology 19, R812-R822.

McBride, M.J., and Ensign, J.C. (1987). Metabolism of endogenous trehalose by *Streptomyces griseus* spores and by spores or cells of other actinomycetes. J. Bacteriol. 169, 5002-5007.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148.

Murray, R.K., Bender, D., Botham, K., M., Kennelly, P.J., Rodwell, V., et Weil, P.A. (2013). Biochimie de Harper (Bruxelles: De Boeck).

Murry, M.A., Fontaine, M.S. and Torrey, J.G. (1984). Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArl 3 grown in batch culture. Plant Soil 78, 61-78.

Newcomb, W., and Wood, S.M. (1987). Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (Actinomycetales): The microsymbiont of nitrogen-fixing actinorhizal root nodules. Int. Rev. Cytol. 109, 1-88.

Noridge, N.A., and Benson, D.R. (1986). Isolation and nitrogen-fixing activity of *Frankia* sp. strain Cpl1 vesicles. J. Bacteriol. 166, 301-305.

Normand, P., and Lalonde, M. (1982). Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. Can. J. Microbiol. 28, 1133-1142.

Normand, P. (2006). The Families *Frankiaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Acidothermaceae* and *Sporichthyaceae*. Prokaryotes 3, 669-681.

Okabe, M., Kuwajima, T., Satoh, M., Kimura, K., Okamura, K., and Okamoto, R. (1992). Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *J.Ferm. Bioeng.* 73, 292–296

Olano, C., Lombò, F., Méndez, C., and Salas, A.J. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 10, 281-292.

Paquet, V. (1990). Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

Paquet, V., Goma, G., and Soucaille, P. (1992). Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. lett.* 14 (11), 1065-1070

Pawlowski, K., and Demchenko, K.N. (2012). The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* 249, 967-979.

Persson, T., Benson, D. R., Normet, P., Heuvel, B. V., Pujic, P., Chertkov, O., Teshima, H., Bruce, D. C., Detter, C., Tapia, R. and al. (2011). Genome sequence of "*cetidatus frankia datiscae*" Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *datisca glomerata*. *J. Bacteriol.* 193: 7017-7018.

Präve, P., Faust, W., Sitting, W. and Sukatsch, D.A. (1987). Basic biotechnology: a student's guide (New York: VCH).

Prescott, L.M., Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., Coyette, J., et Mergeay, M. (2013). Microbiologie (Bruxelles: de boeck).

Pridham, T.G., Hesseltine, C.W., and Benedict, R.G. (1958). A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* 6, 52-79.

Rocco, C.J. (2010). Propionate metabolism et toxicity in bacteria. Thèse de Doctorat, Université du Wisconsin.

Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Ramón, S. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial. Cell. Factories.* 12, 127-130.

Romeo, Y., Bouvier, J. et Guitierrez, C. (2001). La réponse aux stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). INRA, EDP sciences 81, 49-54.

Roussard-Jacquemin, M. (1983). Etude ultrastructurale de la différenciation des hétérocystes chez la Cyanobactérie, *Anabaena cylindrica*. Can. J. Microbiol. 29, 1564-1575.

Russell, N.J. (1989). Functions of lipids: structural roles and membrane functions. Microbial lipids (London: Academic Press). pp 279–365.

Saffroy, S. (2006). Étude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine.

Schauder, S. and Bassler, B.L. (2001) The languages of bacteria. Genes Dev. 15, 1468–1480.

Schweikart, J., and Frank, O. (1997). Fermentation and biochemical engineering hetbook: principles, process design, and equipment. Chem. Eng. 104, 14.

Schwencke, J., and Carú, M. (2001). Advances in actinorhizal symbiosis: host plant-*Frankia* interactions, biology, and applications in arid let reclamation. A review. Arid. Let. Research. and Management. 15, 285-327.

Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (2012). The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. (Maine: Academic Press).

Scriban, R. (1999). Biotechnologie. (Paris: Lavoisier TEC DOC)

Tisa, L., McBride, M., and Ensign, J. (1983). Studies of growth and morphology of *Frankia* strains EAN1pec, Eul1c, Cpl1, et ACN1AG. Can. J. of Bot. 61, 2768-2773.

Thorsten, F and Dierk, S. (2000). The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. FEBS Letters 479, 1-5.

Tjepkema, J.D., Ormerod, W., and Torrey, J.G. (1980). Vesicle formation and acetylene reduction activity in *Frankia* sp. Cpl1 cultured in defined nutrient media. Nature 287, 633-635.

- Tresmerh, D., Hayes, A., and Backuse, J. (1967). Morphology of submerged growth of *Streptomyces* as a taxonomic aid, morphological development of *Streptomyces aureofaciens* in agitated liquid media. *Appl. Microbiol.* **15**, 1185-1191.
- Tunlid, A., Schultz, N.A., Benson, D.R., Steele, D.B., and White, D.C. (1989). Differences in fatty acid composition between vegetative cells and N₂-fixing vesicles of *Frankia* sp. strain Cpl1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3399-3403.
- Vardar, F. (1983). Problems of mass and momentum transfer in large fermentors. *Process. Biochem.* **18**, 21-23.
- Vardar, F., and Lilly, M. D. (1982). Effect of cycling dissolved oxygen concentrations product formation in penicillin fermentations. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 302-311.
- Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M., and Thompson, C.J. (2001). Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation et antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, 3184-3192.
- Viollier, P.H., Kellermen, H.G., Dale, E.G., Nguyen. T.K., Buttner. J.M and Thompson, C.J. (2003) Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **47**(3), 699-714.
- Waksman, S.A. (1967). The Actinomycetes. A summary of current knowledge. *Sciences* **157**, 286.
- Weart, R.B., Lee, A.H., Chien, A., Haeusser, D.P., Hill, N.S., and Levin, P.A. (2007). A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell* **130**, 335-347.
- Weber, A. (1986). Distribution of spore-positive and spore-negative nodules in stets of *Alnus glutinosa* et *alnus incana* in Finlet. *Plant Soil* **96**, 205-213.
- Wisniewski-Dyé, F., and Downie, J.A. (2002). Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antoine Van Leeuwenhoek* **81**, 397-407.
- Xie, Y. (2009). Biological characteristics of *Frankia* isolated from different actinorhizal plants. *Chin. J. App. Eviron. Biol.* **15**, 645-649.
- Xu, H-X., Hong, Y., Zhang, M-Z., Wang, Y-L., Liu, S-S and Wang, X-W. (2015). Transcriptional responses of invasive and indigenous whiteflies to different host plants reveal their disparate capacity of adaptation. *Scientific reports.* **5**: 10774, 1-14.

Young, K.D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiol. and Molecul. Biology Reviews* 70, 660-703.

Zinder, S.H., et Dworkin, M. (2006). Morphological and physiological diversity. *The Prokaryotes* 1, 185-220.

